

516,504

Rec'd PCT/JP03

02 DEC 2004

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003年12月18日 (18.12.2003)

PCT

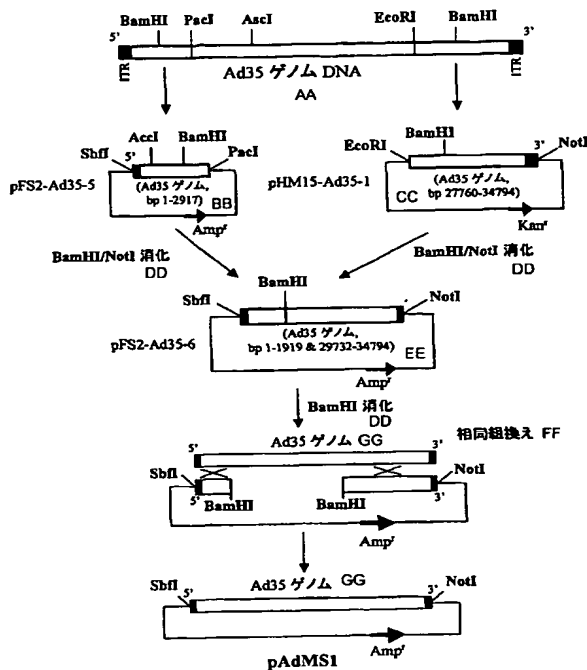
(10) 国際公開番号
WO 03/104469 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/861 // 5/10, 7/01
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/07146
- (22) 国際出願日: 2003年6月5日 (05.06.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-164015 2002年6月5日 (05.06.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 扶桑薬品工業株式会社 (FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市中央区道修町一丁目7番10号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 水口 裕之 (MIZUGUCHI, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒157-0074 東京都世田谷区大蔵6-8-2 1-102 Tokyo (JP). 早川 堯夫 (HAYAKAWA, Takao) [JP/JP]; 〒154-0016 東京都世田谷区弦巻5-1-8-4 35 Tokyo (JP). 櫻井 文教 (SAKURAI, Fuminori) [JP/JP]; 〒158-0098 東京都世田谷区上用賀6-2 3-3-1 05 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,

[続葉有]

(54) Title: ADENOVIRUS VECTOR

(54) 発明の名称: アデノウイルスベクター



AA...Ad35 GENOMIC DNA
BB...(Ad35 GENOMIC, bp 1-2917)
CC...(Ad35 GENOMIC, bp 27780-34794)
DD...DIGESTION
EE...(Ad35 GENOMIC, bp 1-1919 & 29732-34794)
FF...HOMOLOGOUS RECOMBINATION
GG...Ad35 GENOMIC

(57) Abstract: An adenovirus vector which at least contains a partly or fully E1-lacking type 35 adenovirus genome and shows an excellent gene transfer activity on specific cell lines, in particular hematopoietic cells. This adenovirus vector shows an excellent gene transfer activity on specific cell lines, in particular, hematopoietic cells, ES cells, pluripotent stem cells, blood stem cells and tissue stem cells.

(57) 要約: 特定の細胞系統、特に造血細胞に対して優れた遺伝子導入活性を示す。少なくとも、35型アデノウイルスゲノムのE1領域の一部又は全部を欠損させた35型アデノウイルスゲノムを含むアデノウイルスベクターである。本発明に係るアデノウイルスベクターは、特定の細胞系統、特に、造血細胞、ES細胞、多能性幹細胞、血液幹細胞及び組織幹細胞に対して優れた遺伝子導入活性を示す。

WO 03/104469 A1



LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU,
ZA, ZM, ZW.

OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

アデノウイルスベクター

5 技術分野

本発明は、例えば、標的細胞に対して目的の遺伝子を導入する際に使用されるアデノウイルスベクターに関する。

背景技術

- 10 アデノウイルスは、1953年、小児の扁桃腺やアデノイド組織培養液中から分離され、現在までにヒト、トリ、ウシ、サル、イヌ、マウス或いはブタを宿主とする80以上の血清型の存在が明らかにされている。ヒトを宿主とするアデノウイルスについては、これまで51種類以上の血清型が発見されており、その中でも2型と5型とが遺伝子治療用ベクターとして用いられている。
- 15 5型アデノウイルスはエンベロープを持たず、252個のカプソメアよりなる正20面体構造をしている。そのうち頂点にある12個のカプソメアは突起構造を持ったペントン（ペントンベースとファイバーから成る）と呼ばれ、他の240個はヘキソンと呼ばれる。ウイルスの細胞内への侵入（感染）は、ファイバーが受容体のCARに結合し（詳細については、Bergelson J M ら、Isolation of a common
- 20 receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. Science 275:1320-1323, 1997を参照されたい）、その後ペントンベースのRGDモチーフが細胞表面上のインテグリンに結合することによって起こる（Bai M, Harfe B, Freimuth P、Mutations that alter an Arg-Gly-Asp (RGD) sequence in the
- 25 adenovirus type 2 penton base protein abolish its cell-rounding activity and delay virus reproduction in flat cells. J. Virol. 67: 5198-5205, 1993; Wickham T J ら、Integrins $\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$ promote adenovirus internalization but not virus attachment. Cell 73:309-319, 1993)。エンドソームに達したウイルスは酸性条件下でカプシド蛋白質の構造変化を起こし、エンドソームを破壊して、細胞質内に侵入する。従って、細胞表面上の受容体であるCARに、ウイルスのフ

ファイバーが結合するのが感染の第一ステップであり、ファイバーを修飾することにより、ベクターの感染域を変えることができると考えられる (Paillard, F., Dressing up adenoviruses to modify their tropism. Hum. Gene Ther. 10:2575-2576, 1999)。

- 5 一方、35 型のアデノウイルスは、当初、腎臓移植患者、骨髄移植患者、AIDS 患者等の尿中から発見され、その感染により急性出血性膀胱炎を引き起こし、腎臓に感染すると言われている。35 型アデノウイルスの感染受容体は現在のところ不明である。

10 発明の開示

ところで、外来遺伝子を目的の細胞に導入する際に用いられるベクターとしては、ヒトを宿主とする 2 型、5 型及び 7 型アデノウイルス、ヒト以外を宿主とするアデノウイルスでは、チンパンジーアデノウイルス、マウスアデノウイルス、イヌアデノウイルス、ヒツジアデノウイルス及びトリアデノウイルス等が知られ
15 ている。

ところが、上述したようなアデノウイルスを用いたベクターには、目的とする細胞の種類によっては感染力が十分でなく、或いは遺伝子導入効率が十分でないため、所期の目的を達成することができないといった問題があった。

- そこで本発明は、特定の細胞系統、特に、造血細胞、ES 細胞、多能性幹細胞、
20 血液幹細胞及び組織幹細胞に対して優れた遺伝子導入活性を示すアデノウイルスベクターを提供することを目的とする。

上述した目的を達成した本発明は、以下を包含する。

1. 少なくとも、35 型アデノウイルスゲノムの E 1 領域の一部又は全部を欠損させたことを特徴とする、35 型アデノウイルスベクター。
- 25 2. 前記 E 1 領域によってコードされる E 1 タンパク質を発現不可能な状態又は機能的に欠損した状態にさせたことを特徴とする、上記「1.」記載の 35 型アデノウイルスベクター。
3. 前記 E 1 領域の一部が、35 型アデノウイルスゲノムの塩基番号 367 ~ 2917 番目に相当するものである、上記「1.」又は「2.」記載の 35 型ア

デノウイルスベクター。

4. 前記E 1領域の一部が、35型アデノウイルスゲノムの塩基番号367～3375番目に相当するものである、上記「1.」又は「2.」記載の35型アデノウイルスベクター。

5 5. 35型アデノウイルスゲノムのE 3領域の一部又は全部をさらに欠損させたことを特徴とする、上記「1.」記載の35型アデノウイルスベクター。

6. 前記E 3領域の一部が、35型アデノウイルスゲノムの塩基番号27760～29732番目に相当するものである、上記「5.」記載の35型アデノウイルスベクター。

10 7. E 1領域及び/又はE 3領域の一部又は全部を欠損した部位を、外来遺伝子の挿入部位とすることを特徴とする、上記「1.」乃至「6.」いずれか1記載の35型アデノウイルスベクター。

8. 以下の製造工程、

15 (1) 35型アデノウイルスゲノムのE 1領域の一部又は全部を欠損させた35型アデノウイルスベクターを準備する工程、

(2) 該ベクターをアデノウイルスのE 1タンパク質及びE 4タンパク質を発現する細胞に感染・増殖させる工程、及び

(3) 増殖した該ベクターを回収する工程
を含む、35型アデノウイルスベクターの製造方法。

20 9. 前記(1)の工程において、さらに、E 3領域の一部又は全部を欠損させる工程を含むことを特徴とする、上記「8.」記載の35型アデノウイルスベクターの製造方法。

10. 前記(1)と(2)の工程の間に、欠損した部位に外来遺伝子を挿入する工程を含むことを特徴とする、上記「8.」記載の35型アデノウイルスベクターの製造方法。

11. 前記(2)の工程において、細胞が293細胞であることを特徴とする、上記「8.」記載の35型アデノウイルスベクターの製造方法。

12. 上記「8.」乃至「11.」いずれか1記載の35型アデノウイルスベクターの製造方法によって得られた35型アデノウイルスベクター。

13. 以下の製造工程、

(1) E1領域の一部又は全部を欠損させた35型アデノウイルスゲノムの一部を準備する工程、

(2) 前記35型アデノウイルスゲノムの一部と35型アデノウイルスゲノムの残りの部分とを連結させ、35型アデノウイルスゲノムのE1領域の一部又は全部を欠損させた35型アデノウイルスベクターを準備する工程、

(3) 該ベクターをアデノウイルスのE1タンパク質及びE4タンパク質を発現する細胞に感染・増殖させる工程、及び

(4) 増殖した該ベクターを回収する工程

10 を含む、35型アデノウイルスベクターの製造方法。

14. 前記(1)または(2)の工程において、さらに、E3領域の一部又は全部を欠損させる工程を含むことを特徴とする、上記「13.」記載の35型アデノウイルスベクターの製造方法。

15 15. 前記(1)の工程において、欠損した部位に外来遺伝子を挿入する工程を含むことを特徴とする、上記「13.」記載の35型アデノウイルスベクターの製造方法。

16. 前記(3)の工程において、細胞が293細胞であることを特徴とする、上記「13.」記載の35型アデノウイルスベクターの製造方法。

20 17. 前記(1)に記載の35型アデノウイルスゲノムの一部が、塩基番号1～7932番目において367～2917番目又は367～3375番目を欠失したものに相当するものであることを特徴とする、上記「13.」記載の35型アデノウイルスベクターの製造方法。

18. 上記「13.」乃至「17.」いずれか1記載の35型アデノウイルスベクターの製造方法によって得られた35型アデノウイルスベクター。

25 19. 上記「1.」乃至「7.」、「12.」及び「18.」いずれか1記載の35型アデノウイルスベクターを標的細胞に感染させる、遺伝子導入方法。

20. 前記標的細胞が、造血細胞、血液幹細胞、ES細胞、多能性幹細胞および組織幹細胞からなる群から選ばれる細胞である、上記「19.」記載の遺伝子導入方法。

21. 前記標的細胞が、CD34陽性細胞であることを特徴とする、上記「19.」記載の遺伝子導入方法。

以下、本発明を詳細に説明する。

5 本発明のアデノウイルスベクターは、少なくとも、35型アデノウイルスゲノムのE1領域の一部又は全部を欠損させたものである。以下の説明において、E1領域の一部又は全部を欠損させた部位若しくは領域を、「E1欠損領域」と呼ぶ場合もある。また、本発明において、「E1領域の一部又は全部を欠損させる」とは、E1領域によってコードされるE1タンパク質を発現不可能な状態又は機能的に欠損した状態にさせることを含む意味である。また、本発明のアデノウイルスベクターは、E1欠損領域を有するものであれば、35型アデノウイルスゲノムの一部からなるものであっても良い。また、本発明のアデノウイルスベクターは、E1欠損領域を有する35型アデノウイルスゲノムの全部からなるものであっても良い。なお、以下の説明及び図面において、35型アデノウイルスを「Ad35」と略記する場合もある。

15 E1欠損領域を有し、35型アデノウイルスゲノムの一部からなるアデノウイルスベクターは、例えば、35型アデノウイルスゲノムのE1領域を含む断片を制限酵素で切り出し、当該断片におけるE1領域を欠損させて得た35型アデノウイルスゲノムの一部を所定のベクターに連結し、E1タンパク質及びE4タンパク質を発現する293細胞にトランスフェクションした後、当該細胞から回収することによって得ることができる。

25 具体的には、例えば、35型アデノウイルスゲノムの一部からなるアデノウイルスベクターは、35型アデノウイルスゲノムの塩基配列1～7932番目において367～2917番目を欠失した(E1欠損領域)塩基配列からなるものが挙げられる。なお、35型アデノウイルスゲノムの塩基配列における番号は、Gene Bank データベースに Accession Number: AX049983 として登録された塩基配列に基づく番号である。35型アデノウイルスゲノムの塩基配列を配列番号1に示す。

ここで、35型アデノウイルスゲノムのE1領域とは、一般に知られているアデノウイルスの増殖に必須なタンパク質であるE1タンパク質をコードする領域を

意味する。35 型アデノウイルスゲノムの E1 領域の一部とは、35 型アデノウイルスゲノムの塩基配列における 367～2917 番目に相当し、制限酵素 AccI と PacI とで 35 型アデノウイルスゲノムを処理したときに生ずる 2550bp の断片に存在する。また、E1 領域の一部とは、35 型アデノウイルスゲノムの塩基配列における 367～
5 3375 番目に相当し、35 型アデノウイルスゲノムを制限酵素 AccI と BamHI とで処理したときに生ずる 3008bp の断片に存在する。さらに、E1 領域は、E1a 領域及び E1b 領域から構成されている。

特に、E1 欠損領域とは、E1 タンパク質をコードする領域を機能的に欠損させた領域を意味する。機能的に欠損させるとは、例えば、宿主細胞内で機能するかたちで E1 タンパク質を発現させないことを意味する。したがって、本発明に係るアデノウイルスベクターは、E1 領域の全体を欠失している必要はなく、E1 領域の一部を有するものであっても良い。すなわち、本発明に係るアデノウイルスベクターは、宿主細胞内で機能する E1 タンパク質を発現しなければ、35 型アデノウイルスゲノム E1 領域の一部を有するものであってもよい。また、E1 欠損領域とは、
10 E1 タンパク質をコードする領域を機能的に欠損させているならば、E1a 領域及び E1b 領域のうちいずれか一方の全部又は一部を欠損させたものでも良いし、両方を全部欠損させたものでも良いし、両方に跨って一部を欠損させたものでも良い。

なお、本発明に係るアデノウイルスベクターは、E1 欠損領域の他に、E3 領域を欠損させた 35 型アデノウイルスゲノムの一部又は全部であっても良い。35 型アデノウイルスゲノムにおける E3 領域は、35 型アデノウイルスゲノムを EcoRI 及び BamHI で処理し、27760～29732 番目に相当する部位を除くことで欠損させることができる。E1 欠損領域の他に、E3 領域を欠損させた 35 型アデノウイルスゲノムを用いることで、サイズが大きい外来塩基配列を E1 欠損領域に挿入することができる。
20

さらに、本発明に係るアデノウイルスベクターは、E1 欠損領域を有し、35 型アデノウイルスゲノムに存在する遺伝子の一部を欠損させることにより免疫反応を減弱させたものであってもよい。言い換えると、本発明に係るアデノウイルスベクターは、E1 欠損領域を有し、35 型アデノウイルスゲノムの一部からなる、いわゆる gutted(gutless)アデノウイルスベクターであってもよい。
25

また、本発明の組換えアデノウイルスベクターは、E1 欠損領域に外来塩基配列を有し、且つ、E1 欠損領域を除く 35 型アデノウイルスゲノムの全部を含むベクターである。この組換えアデノウイルスベクターは、本発明のアデノウイルスベクターを用いて作製することができる。すなわち、E1 欠損領域を有し、35 型アデノウイルスゲノムの一部を有するアデノウイルスベクター、或いは、E1 欠損領域を有し、35 型アデノウイルスゲノムの全部を有するアデノウイルスベクターいずれからも作製することができる。

E1 欠損領域を有し、35 型アデノウイルスゲノムの一部を有するアデノウイルスベクターを用いて本発明の組換えアデノウイルスベクターを作製する際には、先ず、アデノウイルスベクターにおける E1 欠損領域に外来塩基配列を挿入した後、35 型アデノウイルスゲノムの残りの部分と連結し、E1 タンパク質及び E4 タンパク質を発現する 293 細胞にトランスフェクションした後、当該細胞から回収することによって上記外来塩基配列を有する組換えアデノウイルスベクターを作製することができる。また、E1 欠損領域を有する 35 型アデノウイルスゲノムの全部からなるアデノウイルスベクターの場合は、E1 欠損領域に外来塩基配列を挿入することによって、上記塩基配列を有する組換えアデノウイルスベクターとすることができる。

一般に、アデノウイルスにおいて E1 領域を欠損させると、E1 タンパク質を発現している細胞（例えば、293 細胞）以外で増殖することができない。例えば、遺伝子導入ベクターとして使用されている 5 型アデノウイルスの E1 領域欠損型は、293 細胞では増殖することができるが、遺伝子導入標的細胞では増殖できない。

35 型アデノウイルスにおいて E1 領域を欠損させると、5 型アデノウイルスの E1 タンパク質及び E4 タンパク質を発現する細胞において増殖することができるが、E1 タンパク質を発現し、E4 タンパク質を発現しない細胞では増殖することができない。すなわち、5 型アデノウイルスの E1 領域欠損型と、E1 領域を欠損させてなる 35 型アデノウイルスとは、増殖の特性が異なっている。

E1 欠損領域に挿入する外来塩基配列としては、何ら限定されないが、例えば、タンパク質或いはペプチドをコードする塩基配列、所定の遺伝子の制御領域に存在する塩基配列、所定のタンパク質が結合できる塩基配列等、如何なる塩基配列

であってもよい。特に、外来塩基配列としては、いわゆる遺伝子治療に効果が認められる、或いは効果があるとされる遺伝子を使用することが好ましい。更に好ましくは、遺伝子治療としては、造血細胞、ES 細胞、多能性幹細胞、血液幹細胞又は組織幹細胞に関する疾患或いは疾病の治療或いは予防、及び、造血細胞、ES 細胞、多能性幹細胞、血液幹細胞又は組織幹細胞に起因する症状の改善を目的とした遺伝子治療を挙げることができる。

また、外来塩基配列として、発現を制御するプロモーター配列、ルシフェラーゼをコードする遺伝子及びポリ A 配列をこの順で有する塩基配列とした場合、遺伝子導入標的細胞における導入効率を、ルシフェラーゼ活性を測定して評価できる。また、ルシフェラーゼをコードする遺伝子に代えて、グリーン蛍光タンパク質（いわゆる GFP）をコードする遺伝子を用いた場合には、遺伝子導入標的細胞におけるグリーン蛍光を測定することで、遺伝子導入標的細胞における導入効率を評価できる。

ここで、遺伝子導入標的細胞としては、CD34⁺細胞或いは造血幹細胞等の造血細胞を使用することが好ましい。造血細胞において、35 型アデノウイルスに対する感染受容体は未知である。ルシフェラーゼ遺伝子や GFP 遺伝子等の外来塩基配列を有する組換えアデノウイルスベクターは、外来塩基配列の導入量を測定できるため、造血細胞における感染受容体を探求する際に有用なものとなる。また、遺伝子導入標的細胞としては、ES 細胞、多能性幹細胞、血液幹細胞及び組織幹細胞を使用することができる。

なお、35 型アデノウイルスがヒト CD34⁺細胞に対して高い親和性を示し、5 型アデノウイルスのキャプシドに 35 型アデノウイルスのファイバー領域の一部を含むキメラベクター（Ad5/F35）がヒト CD34⁺細胞に対して高い効率で遺伝子を導入することが知られている（Shayakhmetov, D. M., Papayannopoulou, T., Stamatoyannopoulos, G. & Lieber, A. (2000). Efficient gene transfer into human CD34(+) cells by a retargeted adenovirus vector. J. Virol. 74, 2567-2583.）。

これに対して、本発明の組換えアデノウイルスベクターは、ヒト CD34⁺細胞等の造血細胞に対して高い親和性を持って感染することができるだけでなく、造血

細胞に外来ペプチドをコードする塩基配列を効率よく導入することができる。

また、本発明の組換えアデノウイルスベクターは、繰り返し投与時に有用である。一般に用いられている 5 型アデノウイルスベクターで対象動物に繰り返し投与を行った場合には、対象動物内における抗原抗体反応の結果、投与回数を重ねるに従って遺伝子導入効率が低下してしまうことが知られている。

したがって、例えば、一般に用いられている 5 型アデノウイルスベクターで対象動物に単回投与を行った後、本発明の組換えアデノウイルスベクターで当該対象動物に複数回目の投与を行うことによって、優れた効率で複数回目の投与による遺伝子導入を行うことができる。

- 10 本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2002-164015 号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

- 15 図 1 は、35 型アデノウイルスゲノムを有するプラスミド pAdMS1 の構築過程を示す図である。

図 2 は、GFP 発現カセットを有する Ad35GFP の構築過程を示す図である。

図 3 は、Ad5GFP、Ad5F35GFP 及び Ad35GFP を用いた遺伝子導入の結果の蛍光強度を示す特性図である。

- 20 図 4 は、Ad5L、Ad5F35L 及び Ad35L を用いた遺伝子導入の結果のルシフェラーゼ活性を示す特性図である。

図 5 は、Ad35 を用いた in vivo 繰り返し投与実験の結果を示す特性図である。

発明を実施するための最良の形態

- 25 以下に実施例を示して本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。

〔実施例 1〕

35 型アデノウイルスベクターの作製

・プラスミドの作製

先ず、35 型アデノウイルスゲノムの両末端に、SbfI 認識配列及び NotI 認識配

列を付加したプラスミド (pAdMS1) を作製した。作製手順を図 1 に示す。

pAdMS1 を作製する際には、先ず、35 型アデノウイルスを ATCC (American Type Culture Collection) から入手した (ATCC 番号: VR-718)。入手した 35 型アデノウイルスを HeLa 細胞で増殖させ、CsCl 密度勾配法で精製した。次に 35 型アデノウイルスをプロテイナーゼ K で処理して、35 型アデノウイルスのゲノム DNA を単離した。次に、単離したゲノム DNA の 5' 末端に SbfI 部位を付加した後、ゲノム DNA を PacI で処理し、生じた 2917b の断片を pFS2 ベクターの SbfI/PacI 部位にクローニングした。2917b の断片をクローニングした pFS2 ベクターを pFS2-Ad35-5 とした。クローニングした 2917b の断片は 35 型アデノウイルスゲノムの 5' 側の ITR を含んでいた。また、単離したゲノム DNA の 3' 末端に NotI 部位を付加した後、ゲノム DNA を EcoRI で処理し、生じた 7034b の断片を pHM15 ベクターの EcoRI/NotI 部位にクローニングした。7034b の断片をクローニングした pHM15 ベクターを pHM15-Ad35-1 とした。クローニングした約 7kb の断片は 35 型アデノウイルスゲノムの 3' 側の ITR を含んでいた。

なお、pFS2 ベクターは、pGEM7Zf(+) (プロメガ社製) の XbaI/XhoI/EcoRI/KpnI/SmaI/Csp45I/ClaI/HindIII/BamHI/SacI 部位を SbfI/SwaI/PacI/AscI/SgfI/NotI 部位に変えたベクターである。pHM15 ベクターは、pHM5 (Mizuguchi, H. and Kay, M. A. A simple method for constructing E1 and E1/E4 deleted recombinant adenovirus vector. Hum. Gene Ther., 10, 2013-2017 (1999)) の I-CeuI/HindIII/SphI 部位を XbaI/AvrII/NheI/SpeI/NotI 部位に、PI-SceI 部位を PvuII/ApaI/SpeI/NheI/AvrII/XbaI 部位に変えたベクターである。

次に、これら pFS2-Ad35-5 及び pHM15-Ad35-1 をそれぞれ、BamHI 及び NotI で消化した。これにより pFS2-Ad35-5 は、ゲノム DNA 由来の領域に存在する BamHI 認識部位で切断されて直鎖状となった。一方、定法に従って pHM15-Ad35-1 からは、ゲノム DNA 由来の領域を含む BamHI-NotI 断片を切り出した。直鎖状となった pFS2-Ad35-5 と切り出された BamHI-NotI 断片とを連結することによって得られたベクターを pFS2-Ad35-6 とした。

次に、得られた pFS2-Ad35-6 を BamHI で消化して直鎖状とした。直鎖状とした pFS2-Ad35-6 と 35 型アデノウイルスのゲノム DNA とを用いて大腸菌 BJ5183 株に

形質転換した。これにより、大腸菌 BJ5183 株内で pFS2-Ad35-6 と 35 型アデノウイルスゲノムのゲノム DNA との間で相同組換えが起こる。その後、定法に従って大腸菌 BJ5183 株からプラスミドを抽出することによりプラスミド pAdMS1 を作製した。

- 5 次に、プラスミド pAdMS1 を用いて GFP を発現する組換えアデノウイルスベクターを作製した。作製手順を図 2 に示す。まず、35 型アデノウイルスのゲノム DNA を PacI 及び AscI で消化して当該ゲノム DNA の 2917～7932 番目に相当する PacI/AscI 断片を切り出した。次に、pFS2-Ad35-5 を AccI 及び PacI で消化して 35 型アデノウイルスのゲノム DNA における 367～2917 番目に相当する AccI/PacI
10 断片を除去するとともに AccI 認識部位を PacI 認識部位に変換した。これを、さらに PacI 及び AscI で消化した後、35 型アデノウイルスのゲノム DNA の 2917～7932 番目に相当する PacI/AscI 断片を連結することにより、当該ゲノム DNA の 1～7932 番目の塩基配列における 367～2917 番目が欠失するとともに AccI 認識部位が PacI 認識部位に変換された塩基配列を有するプラスミドを構築した。このプラス
15 ミドを pFS2-Ad35-7 とした。

- 次に、サイトメガロウイルスプロモーター (CMV)、GFP 遺伝子及びウシ成長ホルモン (BGH) ポリ A 配列がこの順で連結されてなる GFP 発現カセットを、pFS2-Ad35-7 の PacI 認識部位に組み込みクローニングした。このプラスミドを pFS2-Ad35-7-GFP1 とした。次に、この pFS2-Ad35-7-GFP1 及び pAdMS1 (図 1) を、
20 それぞれ SbfI 及び AscI で消化し、pFS2-Ad35-7-GFP1 における GFP 発現カセットを含む断片と、pAdMS1 における SbfI/AscI 断片 (ゲノム DNA における 1～7932 番目に相当) を除いた断片とを連結した。その結果、E1 欠損領域に GFP 発現カセットを組み込んだ 35 型アデノウイルスのゲノム DNA を有するプラスミド pAdMS1-GFP1 を構築できた。

- 25 一方、E1 欠損領域にルシフェラーゼ発現カセットを組み込んだ 35 型アデノウイルスのゲノム DNA を有するプラスミド pAdMS1-L2 は、pAdMS1-GFP1 と同様にして構築した。

・組換えアデノウイルスベクターの構築

得られた pAdMS1-GFP1 及び pAdMS1-L2 は、以下のように組換えアデノウイルス

ベクターとして構築した。すなわち、先ず、これら pAdMS1-GFP1 及び pAdMS1-L2 を、それぞれ SbfI 及び NotI で消化し、E1 遺伝子とともに E4 遺伝子を発現する 293 細胞 (VK10-9) へトランスフェクトした。トランスフェクト後、10~14 日で細胞変性効果が観測され、各プラスミド由来のウイルスが増幅していることを確認した。各プラスミド由来のウイルスは、定法 (Lieber, A. ら、J. Virol. 70, 8944-8960 (1996)) に従って精製した。

その結果、pAdMS1-GFP1 由来のウイルス (Ad35GFP) の収量は、 10^{11} ウイルス粒子/ml の濃度で約 1.5ml 得られた。これは、5 型アデノウイルスの場合とほぼ同等又はやや低い収量であった。なお、pAdMS1-L2 由来のウイルス (Ad35L) も同様に精製した。以上により、GFP 発現カセットが組み込まれた 35 型アデノウイルスベクター及びルシフェラーゼ発現カセットが組み込まれた 35 型アデノウイルスベクターを構築することができた。

なお、比較のために、通常の 5 型アデノウイルスベクター (Ad5) 及びファイバー領域を 35 型のファイバーに置換した 5 型アデノウイルスベクター (Ad5F35) を用いて、GFP 発現カセット又はルシフェラーゼ発現カセットを組み込んだベクター (Ad5GFP 及び Ad5F35GFP) を構築した。

Ad35GFP に関してプラーク形成単位 (PFU) とウイルス粒子力価との比率は 1:133 であり、Ad5F35GFP に関して当該比率は 1:24 であり、Ad5GFP に関して当該比率は 1:56 であり、Ad35L に関して当該比率は 1:225 であり、Ad5F35L に関して当該比率は 1:13 であり、Ad5L に関して当該比率は 1:13 であった。なお、PFU の測定は、Kanegae Y et al Jpn. J. Med. Sci. Biol. 1994;47:157-166 に記載された方法に準じて行った。ウイルス粒子力価の測定は、Maizel Jv et al Virology. 1968;36:115-125 に記載された方法に準じて行った。

・血球細胞に対する遺伝子導入実験

上記で構築された組換えアデノウイルスベクター (Ad35GFP 及び Ad35L) を用いて血球細胞への遺伝子導入を行った。血球細胞としては、ヒト CD34⁺細胞 (バイオイッタカー社より入手) を用いた。製造元の取扱説明書によれば、95%以上の細胞が CD34 陽性であった。

遺伝子導入実験開始 16~20 時間前に、ヒト CD34⁺細胞を凍結保存状態から回復

させ、StemSpan (商標) 2000 (ステム・セル・テクノロジー社より入手) に溶解した。なお、StemSpan (商標) 2000 にサイトカインカクテル StemSpan (商標) CC100 (ヒト flt-3 リガンド(100ng/ml)、ヒト幹細胞因子(100ng/ml)、ヒトインターロイキン-3(20ng/ml)及びヒトインターロイキン-6(20ng/ml)) を加えて実験に用いた。その後、ヒト CD34⁺細胞を、24 ウェルプレートに 1×10^5 cell/well となるように播種した。そして、Ad35GFP、Ad5GFP 及び Ad5F35GFP をそれぞれ 3、30 及び 300PFU/cell の濃度となるように希釈し、各濃度で Ad35GFP、Ad5GFP 及び Ad5F35GFP を用いてヒト CD34⁺細胞に対して遺伝子導入を行った。

48 時間後、ヒト CD34⁺細胞内における GFP 遺伝子の発現を、CellQuest ソフトウェア (ベクトン・ディキンソン社製) を用いた FACScalibur フローサイトメータでフローサイトメトリーによって解析した。結果を図 3 に示す。

また、Ad35L、Ad5L 及び Ad5F35L を用いる場合には、ヒト CD34⁺細胞を 96 ウェルプレートに 1×10^4 cell/well となるように播種し、Ad35L、Ad5L 及び Ad5F35L それぞれ 3、30、100 及び 300PFU/cell の濃度、並びに 300、3000、6000 及び 9000 ベクター粒子/cell の濃度となるように希釈し、各濃度で Ad35L、Ad5L 及び Ad5F35L を用いてヒト CD34⁺細胞に対して遺伝子導入を行った。48 時間後、ヒト CD34⁺細胞内におけるルシフェラーゼ遺伝子の発現を、ルシフェラーゼアッセイシステム (Pica gene LT2.0、東洋インキ社製) を用いて評価した。結果を図 4 に示す。なお、図 4 において「B-1」は各ウイルスを 3、30、100 及び 300PFU/cell の濃度で用いたときの結果を示し、「B-2」は各ウイルスを 300、3000、6000 及び 9000 ベクター粒子/cell の濃度で用いたときの結果を示している。

・各ウイルスによる血球細胞に対する遺伝子導入実験の評価

図 3 に示した結果から、Ad35GFP を用いた場合には、Ad5GFP 及び Ad5F35GFP を用いた場合と比較して、最も高い効率で GFP 遺伝子を導入できることが判った。特に、Ad35GFP を 300PFU/cell 濃度で用いた場合には、59%のヒト CD34⁺細胞で GFP 遺伝子を発現していた。同濃度で Ad5GFP を用いた場合には 5%のヒト CD34⁺細胞で GFP 遺伝子を発現しており、同濃度で Ad5F35GFP を用いた場合には 52%のヒト CD34⁺細胞で GFP 遺伝子を発現していた。Ad35GFP を用いた場合の蛍光強度平均値 (MFI) は、Ad5GFP を用いた場合と比較して 10~70 倍、Ad5F35GFP を用いた場合と比較し

て 2～3 倍であった。

また図 4「B-1」に示した結果から、Ad35L を用いた場合のルシフェラーゼ発現量は、Ad5L を用いた場合と比較して 1000～3000 倍、Ad5F35L を用いた場合と比較して 15～100 倍であった。なお、E4 遺伝子産物を発現する 293 細胞は、5 型アデノウイルスの場合とは異なり、35 型アデノウイルスを完全に産生しない可能性が考えられたため、図 4「B-1」に示したように、PFU 価による遺伝子導入効率は、Ad35L については過小評価される可能性がある。そこで、300、3000、6000 及び 9000 ベクター粒子/cell の各濃度で遺伝子導入効率を評価した。その結果、Ad35L は、図 4「B-2」に示したように、3000 ベクター粒子/cell 以上の濃度で Ad5L 及び Ad5F35L と比較して、高い遺伝子導入効率を示した。

以上の結果から、Ad35 を用いたヒト CD34⁺細胞に対する遺伝子導入は、Ad5 或いは Ad5F35 を用いた遺伝子導入と比較して、非常に優れた効率を達成することができた。このことから、Ad35 を用いた遺伝子導入は、特に、造血幹細胞等の血球細胞に対して有効であることが示された。

15 ・ Ad35 を用いた in vivo 繰り返し投与実験

本例では、1 回目の投与として Ad5 を用いた遺伝子導入及び続く 2 回目の投与として Ad35 を用いた遺伝子導入からなる in vivo 繰り返し投与実験を行い、Ad35 の有用性を検討した。

実験動物としては、マウス (C57B16、日本 SLC より入手) を用いた。また 1 回目の投与には Ad5L を用いた。2 回目の投与には、上述した手法に準じ、ヒト分泌性アルカリフォスファターゼ (SEAP) 発現カセット (RSVSEAP1) を組み込んだ Ad35 (Ad35RSVSEAP1) を用いた。RSVSEAP1 は、ラウス肉腫ウイルス (RSV) プロモーター、SEAP 遺伝子及び BGH ポリ A 配列がこの順で連結されてなる。また、比較としては、2 回目の投与に RSVSEAP1 を組み込んだ Ad5 (Ad5RSVSEAP1) を用いた。in vivo 繰り返し投与実験は以下の手順で行った。

まず、1 回目の投与として Ad5L を 1.5×10^{10} ベクター粒子/Mice の投与量で尾静脈内投与した。一回目投与より 14 日後、Ad5RSVSEAP1 もしくは Ad35RSVSEAP1 を 1.5×10^{10} ベクター粒子/Mice の投与量で筋肉内投与した。二回目の投与より二日後、眼より採血し、血清中のヒト分泌性アルカリフォスファターゼ量 (SEAP

量)を測定した。SEAP 量は、Great EscAPe SEAP Chemiluminescence Detection Kit (クロンテック社より入手)を用いて測定した。またコントロール群としては、一回目投与時には何も投与せず二回目投与時に Ad5RSVSEAP1 もしくは Ad35RSVSEAP1 を筋肉内投与した。

- 5 結果を図 5 に示す。なお、図 5 の各データは、4 回ずつ行った試験の平均値 ± S.D. として示している。縦軸に示す SEAP 量はコントロール群の SEAP 量を 100% としたときの相対値である。図 5 に示すように、1 回目投与及び 2 回目投与において Ad5 を用いた場合には、1 回目未投与群 (コントロール群) と比較して、2 回目の投与に起因する SEAP 量が 5% 以下に低下している。これに対して、1 回目投与に
- 10 おいて Ad5 を用い、2 回目投与において Ad35 を用いた場合には、1 回目未投与群 (コントロール群) と比較して、2 回目の投与に起因する SEAP 量がほぼ同等であった。

- このように、1 回目の投与による遺伝子導入を一般に用いられている Ad5 等のアデノウイルスベクターを用い、複数回目の投与による遺伝子導入を Ad35 を用い
- 15 ることによって、投与回数を重ねるに従って遺伝子導入効率が低下してしまう不都合を回避でき、優れた効率で複数回目の投与による遺伝子導入を行うことができることが示された。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

20

産業上の利用の可能性

以上、詳細に説明したように、本発明によれば、特定の細胞系統、特に造血細胞に対して優れた遺伝子導入活性を示すアデノウイルスベクター、その作製方法及び遺伝子導入方法を提供することができる。

25

請求の範囲

1. 少なくとも、35型アデノウイルスゲノムのE1領域の一部又は全部を欠損させたことを特徴とする、35型アデノウイルスベクター。
- 5 2. 前記E1領域によってコードされるE1タンパク質を発現不可能な状態又は機能的に欠損した状態にさせたことを特徴とする、請求の範囲1記載の35型アデノウイルスベクター。
3. 前記E1領域の一部が、35型アデノウイルスゲノムの塩基番号367～2917番目に相当するものである、請求の範囲1又は2記載の35型アデノ
- 10 ウイルスベクター。
4. 前記E1領域の一部が、35型アデノウイルスゲノムの塩基番号367～3375番目に相当するものである、請求の範囲1又は2記載の35型アデノウイルスベクター。
5. 35型アデノウイルスゲノムのE3領域の一部又は全部をさらに欠損させたことを特徴とする、請求の範囲1記載の35型アデノウイルスベクター。
- 15 6. 前記E3領域の一部が、35型アデノウイルスゲノムの塩基番号27760～29732番目に相当するものである、請求の範囲5記載の35型アデノウイルスベクター。
7. E1領域及び/又はE3領域の一部又は全部を欠損した部位を、外来遺伝子の挿入部位とすることを特徴とする、請求の範囲1乃至6いずれか1記載の35
- 20 型アデノウイルスベクター。
8. 以下の製造工程、
 - (1) 35型アデノウイルスゲノムのE1領域の一部又は全部を欠損させた35型アデノウイルスベクターを準備する工程、
 - 25 (2) 該ベクターをアデノウイルスのE1タンパク質及びE4タンパク質を発現する細胞に感染・増殖させる工程、及び
 - (3) 増殖した該ベクターを回収する工程を含む、35型アデノウイルスベクターの製造方法。
9. 前記(1)の工程において、さらに、E3領域の一部又は全部を欠損さ

せる工程を含むことを特徴とする、請求の範囲 8 記載の 3 5 型アデノウイルスベクターの製造方法。

10. 前記 (1) と (2) の工程の間に、欠損した部位に外来遺伝子を挿入する工程を含むことを特徴とする、請求の範囲 8 記載の 3 5 型アデノウイルスベクターの製造方法。

11. 前記 (2) の工程において、細胞が 2 9 3 細胞であることを特徴とする、請求の範囲 8 記載の 3 5 型アデノウイルスベクターの製造方法。

12. 請求の範囲 8 乃至 11 いずれか 1 項記載の 3 5 型アデノウイルスベクターの製造方法によって得られた 3 5 型アデノウイルスベクター。

13. 以下の製造工程、

(1) E 1 領域の一部又は全部を欠損させた 3 5 型アデノウイルスゲノムの一部を準備する工程、

(2) 前記 3 5 型アデノウイルスゲノムの一部と 3 5 型アデノウイルスゲノムの残りの部分とを連結させ、3 5 型アデノウイルスゲノムの E 1 領域の一部又は全部を欠損させた 3 5 型アデノウイルスベクターを準備する工程、

(3) 該ベクターをアデノウイルスの E 1 タンパク質及び E 4 タンパク質を発現する細胞に感染・繁殖させる工程、及び

(4) 増殖した該ベクターを回収する工程を含む、3 5 型アデノウイルスベクターの製造方法。

14. 前記 (1) または (2) の工程において、さらに、E 3 領域の一部又は全部を欠損させる工程を含むことを特徴とする、請求の範囲 1 3 記載の 3 5 型アデノウイルスベクターの製造方法。

15. 前記 (1) の工程において、欠損した部位に外来遺伝子を挿入する工程を含むことを特徴とする、請求の範囲 1 3 記載の 3 5 型アデノウイルスベクターの製造方法。

16. 前記 (3) の工程において、細胞が 2 9 3 細胞であることを特徴とする、請求の範囲 1 3 記載の 3 5 型アデノウイルスベクターの製造方法。

17. 前記 (1) に記載の 3 5 型アデノウイルスゲノムの一部が、塩基番号 1 ~ 7 9 3 2 番目において 3 6 7 ~ 2 9 1 7 番目又は 3 6 7 ~ 3 3 7 5 番目を欠

失したものに相当するものであることを特徴とする、上記「13.」記載の35型アデノウイルスベクターの製造方法。

18. 請求の範囲13乃至17いずれか1項記載の35型アデノウイルスベクターの製造方法によって得られた35型アデノウイルスベクター。

5 19. 請求の範囲1乃至7、12及び18いずれか1項記載の35型アデノウイルスベクターを標的細胞に感染させる、遺伝子導入方法。

20. 前記標的細胞が、造血細胞、血液幹細胞、ES細胞、多能性幹細胞および組織幹細胞からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲19記載の遺伝子導入方法。

10 21. 前記標的細胞が、CD34陽性細胞であることを特徴とする、請求の範囲19記載の遺伝子導入方法。

図 1

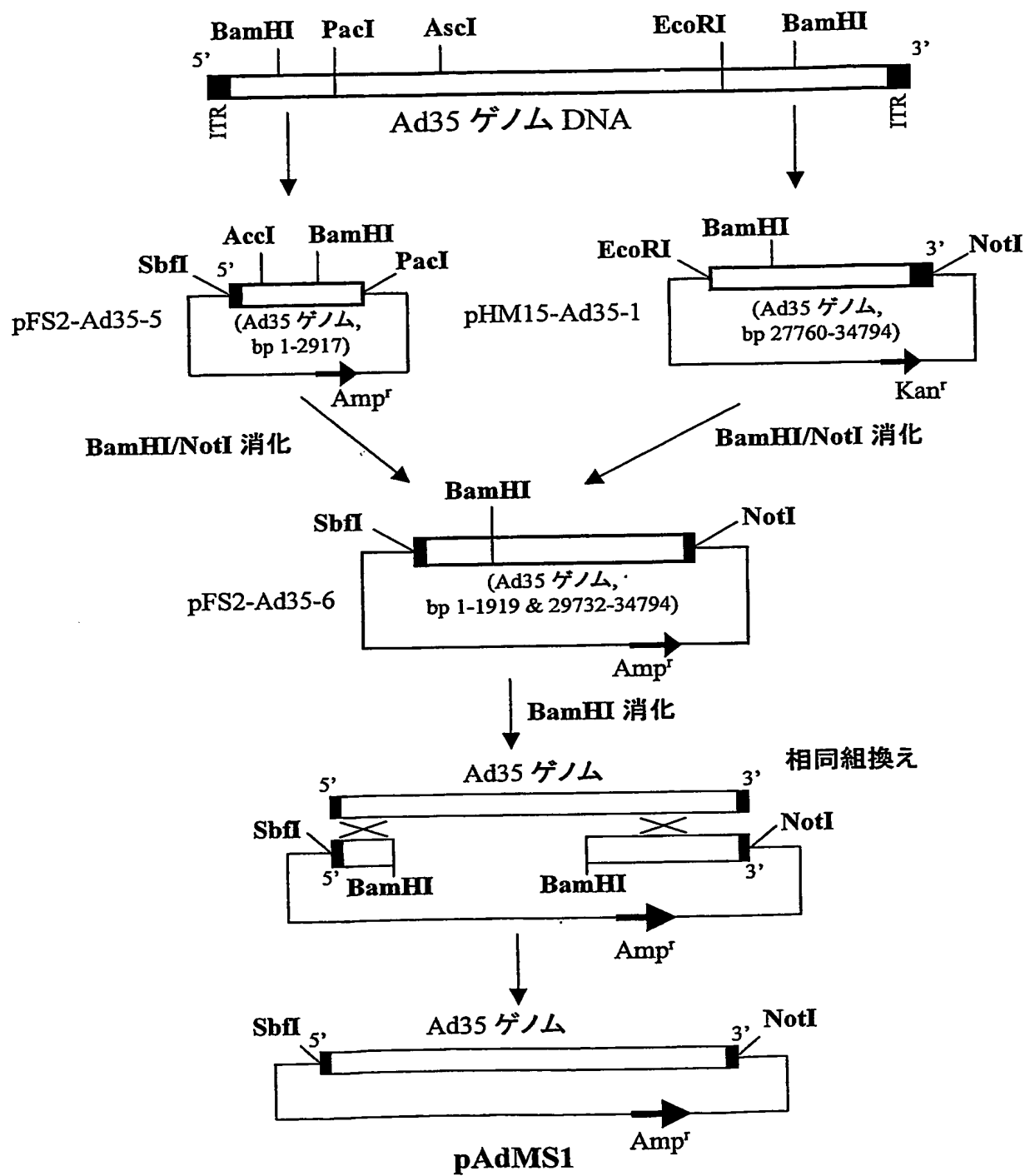


図2

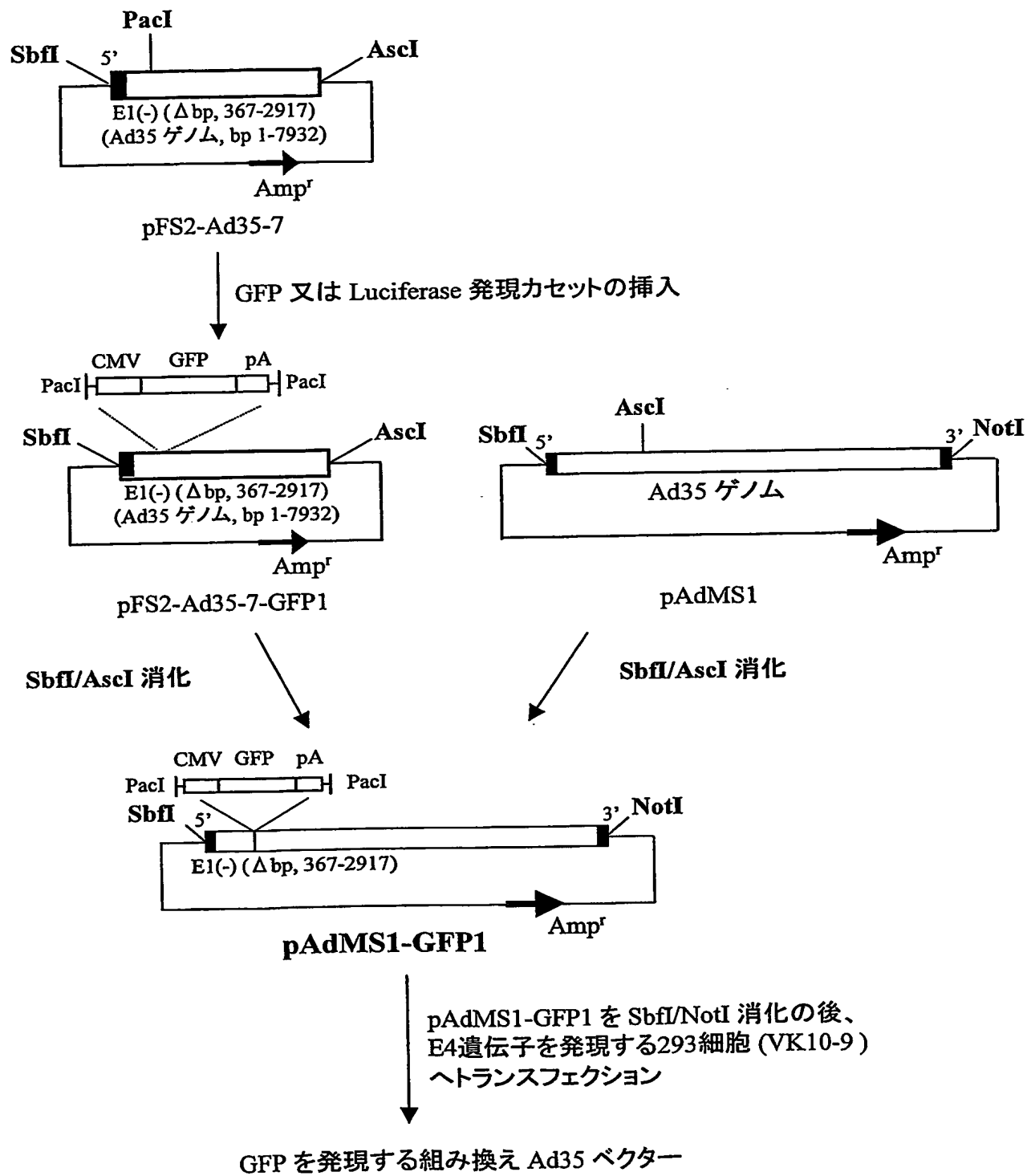


図3

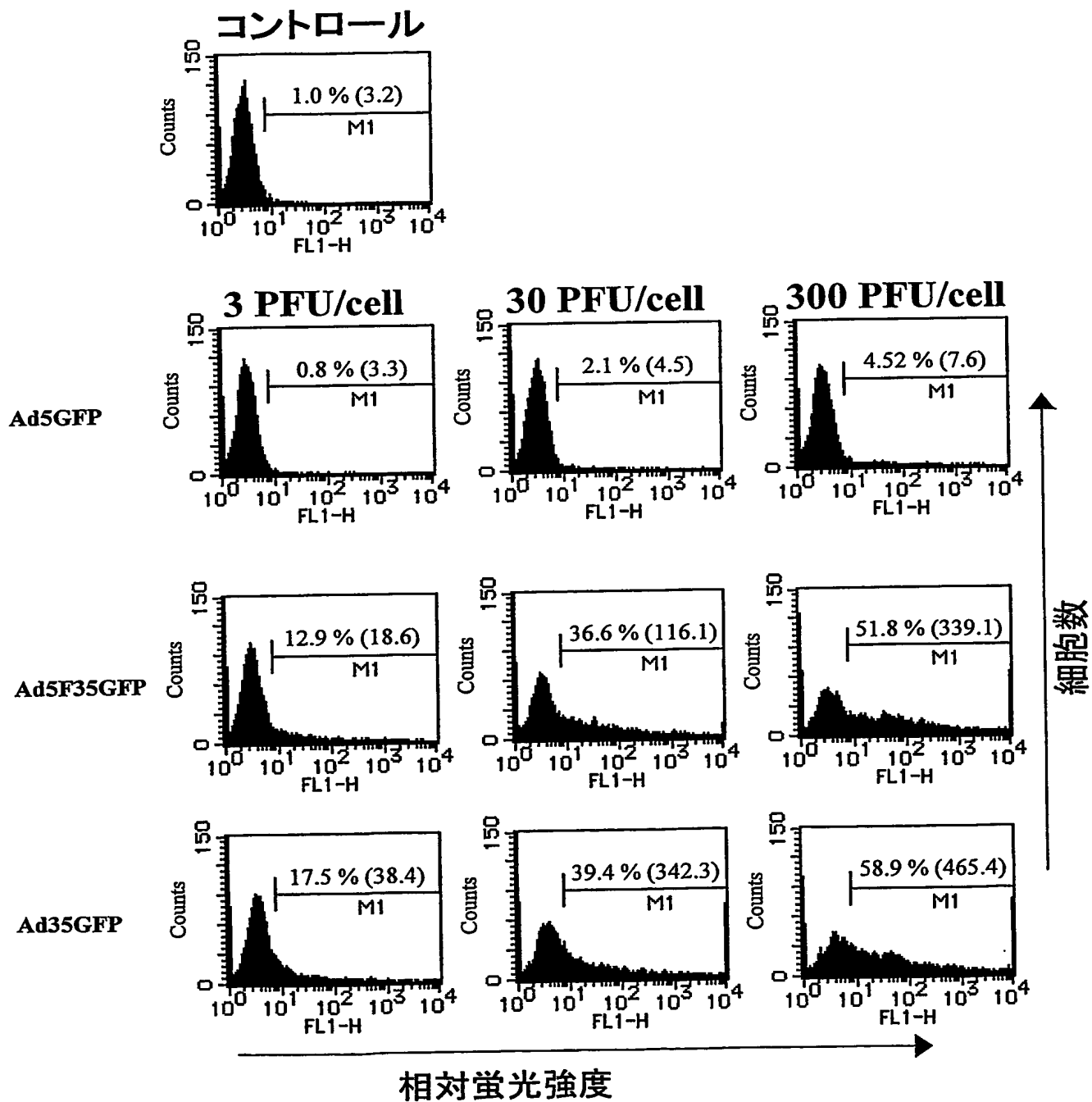


図4

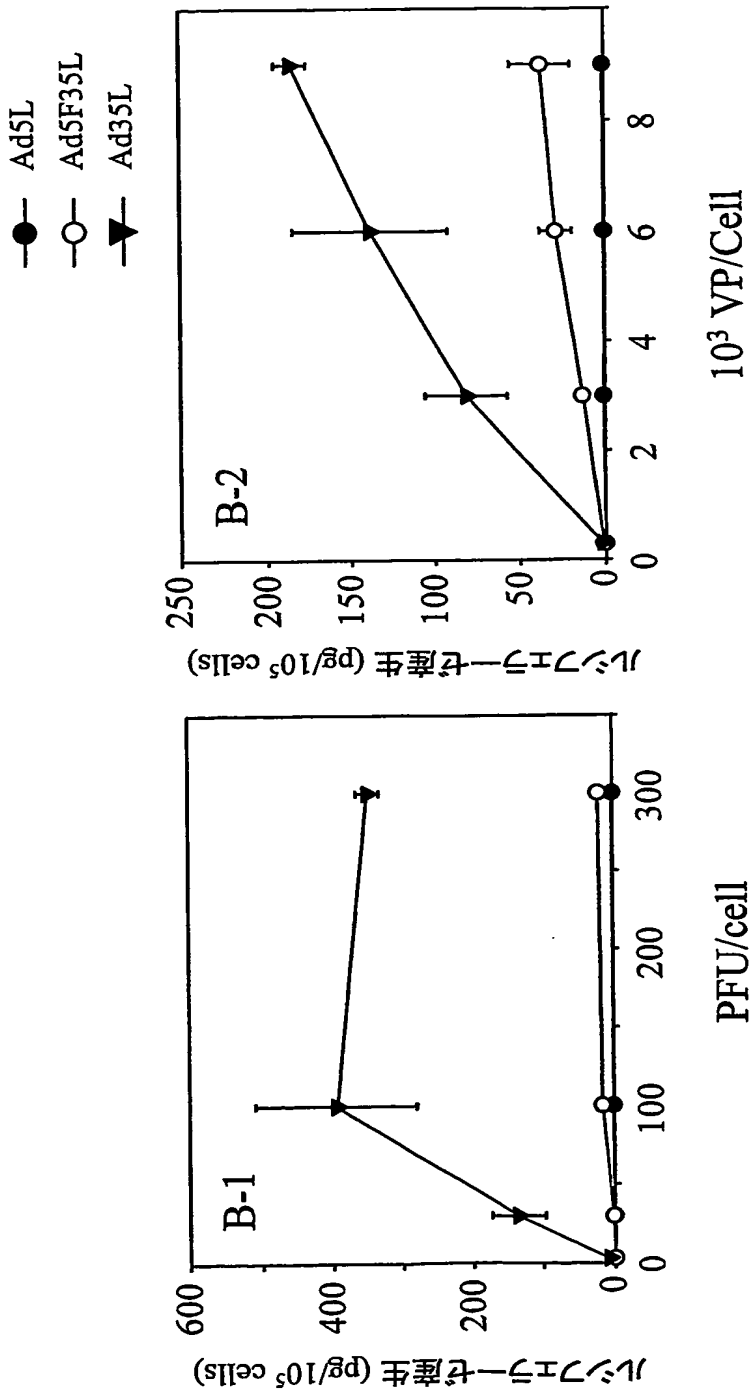
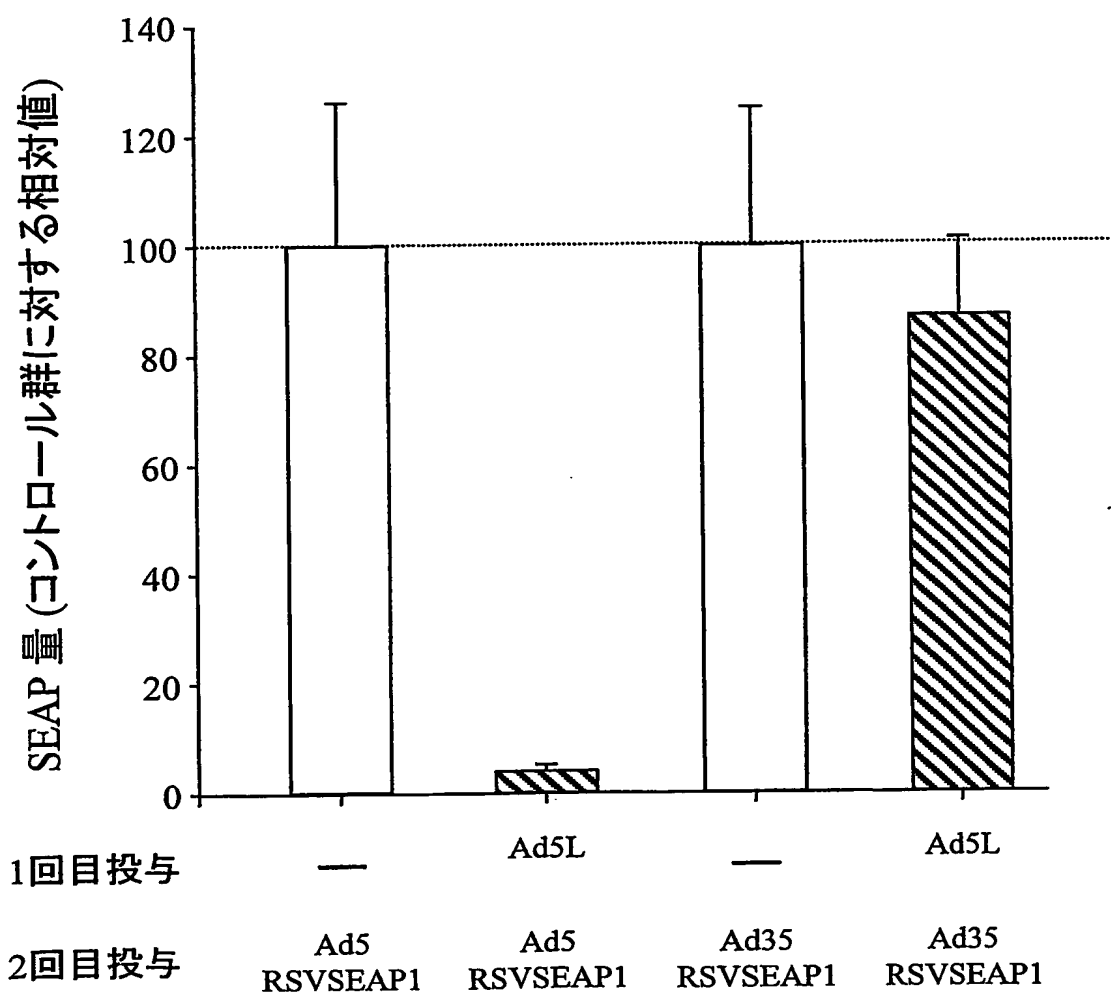


図5



SEQUENCE LISTING

<110> FUSO Pharmaceutical Industries, Ltd.

Hiroyuki, Mizuguchi

Takao, Hayakawa

Fuminori, Sakurai

<120> Adenovirus vector

<130> PH-1823-PCT

<150> JP 2002-164015

<151> 2002-06-05

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 34794

<212> DNA

<213> Adenovirus type 35

<400> 1

catcatcaat aatatacctt atagatggaa tgggtgccaat atgtaaatga ggtgatttta 60
aaaagtgtgg gccgtgtggt gattggctgt ggggttaacg gttaaaaggg gcggcgcggc 120
cgtgggaaaa tgacgtttta tgggggtgga gtttttttgc aagttgtcgc gggaaatgtt 180
acgcataaaa aggcttcttt tctcacggaa ctacttagtt ttcccacggg atttaacagg 240
aaatgaggta gttttgaccg gatgcaagtg aaaattgctg attttcgcgc gaaaactgaa 300

tgaggaagtg tttttctgaa taatgtggta tttatggcag ggtggagtat ttgttcaggg 360
ccaggtagac tttgacccat tacgtggagg tttcgattac cgtgtttttt acctgaattt 420
ccgcgtaccg tgtcaaagtc ttctgttttt acgtaggtgt cagctgatcg ctagggattt 480
tataacctcag ggtttgtgtc aagaggccac tcttgagtgc cagcgagaag agttttctcc 540
tctgcgccgg cagtttaata ataaaaaat gagagatttg cgatttctgc ctcaggaaat 600
aatctctgct gagactggaa atgaaatatt ggagcttggt gtgcacgccc tgatgggaga 660
cgatccggag ccacctgtgc agctttttga gcctcctacg cttcaggaac tgtatgattt 720
agaggtagag ggatcggagg attctaata ggaagctgtg aatggctttt ttaccgattc 780
tatgctttta gctgctaata aaggattaga attagatccg cttttggaca ctttcaatac 840
tccaggggtg attgtggaaa gcggtacagg tgtaagaaaa ttacctgatt tgagttccgt 900
ggactgtgat ttgcactgct atgaagacgg gtttcctccg agtgatgagg aggaccatga 960
aaaggagcag tccatgcaga ctgcagcggg tgagggagtg aaggctgcca atgttggttt 1020
tcagttggat tgcccggagc ttcctggaca tggctgtaag tcttgtgaat ttcacaggaa 1080
aaatactgga gtaaaggaaac tgttatgttc gctttgttat atgagaacgc actgccactt 1140
tatttacagt aagtgtgttt aagttaaaat ttaaaggaat atgctgtttt tcacatgtat 1200
attgagtgtg agttttgtgc ttcttattat aggtcctgtg tctgatgctg atgaatcacc 1260
atctcctgat tctactacct cacctcctga tattcaagca cctgttcctg tggacgtgcg 1320
caagcccatt cctgtgaagc ttaagcctgg gaaacgtcca gcagtggaga aacttgagga 1380
cttgttacag ggtggggacg gacctttgga cttgagtaca cggaaacgtc caagacaata 1440
agtgttccat atccgtgttt acttaagggtg acgtcaatat ttgtgtgaga gtgcaatgta 1500
ataaaaatat gttaactgtt cactggtttt tattgctttt tgggcgggga ctcaggtata 1560
taagtagaag cagacctgtg tggttagctc ataggagctg gctttcatcc atggaggttt 1620
gggccatttt ggaagacctt aggaagacta ggcaactgtt agagagcgct tcggacggag 1680
tctccggttt ttggagattc tggttcgcta gtgaattagc tagggtagtt tttaggataa 1740
aacaggacta taaacaagaa ttgaaaagt tgttggtaga ttgccagga ctttttgaag 1800
ctcttaattt gggccatcag gttcacttta aagaaaaagt tttatcagtt ttagactttt 1860
caaccccagg tagaactgct gctgctgtgg cttttcttac ttttatatta gataaatgga 1920
tcccgcagac tcatttcagc aggggatacg ttttgattt catagccaca gcattgtgga 1980
gaacatggaa ggttcgcaag ataggacaa tcttaggtta ctggccagtg cagccttttg 2040

gtgtagcggg aatcctgagg catccaccgg tcatgccagc ggttctggag gaggaacagc 2100
aagaggacaa cccgagagcc ggcctggacc ctccagtgga ggaggcggag tagctgactt 2160
gtctcctgaa ctgcaacggg tgcttactgg atctacgtcc actggacggg ataggggcgt 2220
taagaggggag agggcatcca gtggtactga tgctagatct gagttggctt taagtttaat 2280
gagtcgcaga cgtcctgaaa ccatttggtg gcatgaggtt cagaaagagg gaagggatga 2340
agtttctgta ttgcaggaga aatattcact ggaacagggtg aaaacatgtt ggttggagcc 2400
agaggatgat tgggcgggtg ccattaaaaa ttatgccaag atagctttga ggcctgataa 2460
acagtataag atcagtagac ggattaatat ccggaatgct tgttacatat ctggaaatgg 2520
ggctgaggtg gtaatagata ctcaagacaa gacagttatt agatgctgca tgatggatat 2580
gtggcctgga gtagtcggta tggaagcagt cacttttgta aatgttaagt ttaggggaga 2640
tggttataat ggaatagtgt ttatggccaa taccaaactt atattgcatg gttgtagctt 2700
ttttggtttc aacaatacct gtgtagatgc ctggggacag gttagtgtac gggggtgtag 2760
tttctatgcg tgttggattg ccacagctgg cagaaccaag agtcaattgt ctctgaagaa 2820
atgcatattc caaagatgta acctgggcat tctgaatgaa ggcaagcaa gggtcctgca 2880
ctgcgcttct acagatactg gatgttttat ttaattaag ggaaatgcca gcgtaaagca 2940
taacatgatt tgtggtgctt ccgatgagag gccttatcaa atgctcactt gtgctgggtg 3000
gcattgtaat atgctggcta ctgtgcatat tgtttcccat caacgcaaaa aatggcctgt 3060
ttttgatcac aatgtgttga ccaagtgcac catgcatgca ggtgggcgta gaggaatgtt 3120
tatgccttac cagtgtaca tgaatcatgt gaaagtgtt ttggaaccag atgccttttc 3180
cagaatgagc ctaacaggaa tctttgacat gaacacgcaa atctggaaga tcctgaggta 3240
tgatgatacg agatcgaggg tgcgcgcatg cgaatgcgga ggcaagcatg ccaggttcca 3300
gccggtgtgt gtagatgtga ccgaagatct cagaccgat catttggtta ttgcccgcac 3360
tgagcagag ttcggatcca gtggagaaga aactgactaa ggtgagtatt gggaaaactt 3420
tggggtggga ttttcagatg gacagattga gtaaaaattt gtttttctg tcttgcagct 3480
gacatgagtg gaaatgcttc ttttaagggg ggagtcttca gcccttatct gacagggcgt 3540
ctcccatcct gggcaggagt tcgtcagaat gttatgggat ctactgtgga tggaagacc 3600
gttcaaccgg ccaattcttc aacgctgacc tatgctactt taagttcttc accttggac 3660
gcagctgcag ccgctgccgc cgctctgtc gccgctaaca ctgtgcttgg aatgggttac 3720
tatggaagca tcgtggctaa ttccacttcc tctaataacc cttctacact gactcaggac 3780

aagttacttg tccttttggc ccagctggag gctttgaccc aacgtctggg tgaactttct 3840
cagcaggtgg ccgagttgcg agtacaaact gagtctgctg tcggcacggc aaagtctaaa 3900
taaaaaaaat tccagaatca atgaataaat aaacgagctt gttgttgatt taaaatcaag 3960
tgtttttatt tcatttttcg cgcacggat ggcctggacc accgatctcg atcattgaga 4020
actcgggtga tttttccag aatcctatag aggtgggatt gaatgtttag atacatgggc 4080
attaggccgt ctttggggtg gagatagctc cattgaaggg attcatgctc cggggtagtg 4140
ttgtaaatca cccagtcata acaaggctgc agtgcattgt gttgcacaat atcttttaga 4200
agtaggctga ttgccacaga taagcccttg gtgtagggtt ttacaaaccg gttgagctgg 4260
gaggggtgca ttcgaggtga aattatgtgc attttgatt ggatttttaa gttggcaata 4320
ttgccgcaa gatcccgctc tgggttcattg ttatgaagga ctaccaagac ggtgtatccg 4380
gtacatttag gaaatttatc gtgcagcttg gatggaaaag cgtggaaaaa tttggagaca 4440
cccttggtgc ctccgagatt ttccatgcac tcattccatga taatagcaat ggggccgttg 4500
gcagcggcgc gggcaaacac gttccgtggg tctgacacat catagtattg ttcctgagtt 4560
aaatcatcat aagccatttt aatgaatttg gggcggagcg taccagattg gggtatgaat 4620
gttccttcgg gcccgggagc atagttcccc tcacagattt gcatttccca agctttcagt 4680
tctgaggggtg gaatcatgtc cacctggggg gctatgaaga acaccgtttc gggggcgggg 4740
gtgattagtt gggatgatag caagtttctg agcaattgag atttgccaca tccggtgggg 4800
ccataaataa ttccgattac aggttgcagg tggtagtta gggaacggca actgccgtct 4860
tctcgaagca agggggccac ctggttcac atttccctta catgcatatt tccccgacc 4920
aaatccatta ggagcgctc tcctcctagt gatagaagtt cttgtagtga ggaaaagttt 4980
ttcagcggtt ttagaccgtc agccatgggc attttgaaa gagtttgctg caaaagttct 5040
agtctgttcc acagttcagt gatgtgttct atggcatctc gatccagcag acctcctcgt 5100
ttcgggggtt tggacggctc ctggagtagg gtatgagacg atgggcgtcc agcgtgcca 5160
gggttcggtc cttccagggt ctcatgttgc gagtcagggt tgtttccgtc acagtgaagg 5220
gggtgtgcgc tgcttgggcg cttgccaggg tgcgcttcag actcattctg ctggtggaga 5280
acttctgtcg cttggcgccc tgtatgtcgg ccaagtagca gtttaccatg agttcgtagt 5340
tgagcgcctc ggctgcgtgg cttttggcgc ggagcttacc tttggaagtt ttcttgcata 5400
ccgggcagta taggcatttc agcgcataca gcttgggcgc aaggaaaatg gattctgggg 5460
agtatgcac cgcgccgag gaggcgcaaa cagtttcaca ttccaccagc caggttaaat 5520

ccggttcatt ggggtcaaaa acaagttttc cgccatattt tttgatgcgt ttcttacctt 5580
tggtctccat aagttcgtgt cctcgttgag tgacaaacag gctgtccgta tctccgtaga 5640
ctgattttac aggcctcttc tccagtggag tgcctcggtc ttcttcgtac aggaactctg 5700
accactctga tacaaaggcg cgcgtccagg ccagcacaaa ggaggctatg tgggaggggt 5760
agcgatcggt gtcaaccagg ggggccacct ttcccaaagt atgcaaacac atgtcacctt 5820
cttcaacatc caggaatgtg attggcttgt aggtgtattt cacgtgacct ggggtccccg 5880
ctgggggggt ataaaagggg gcgggtcttt gctcttcctc actgtcttcc ggatcgctgt 5940
ccaggaacgt cagctgttgg ggtaggtatt ccctctcgaa ggcgggcatg acctctgcac 6000
tcaggttgtc agtttctaag aacgaggagg atttgatatt gacagtgccg gttgagatgc 6060
ctttcatgag gttttcgtcc atttggtcag aaaacacaat ttttttattg tcaagtttgg 6120
tggcaaatga tccatacagg gcgttgata aaagtttggc aatggatcgc atggtttgggt 6180
tcttttcctt gtccgcgcgc tctttggcgg cgatgttgag ttggacatac tcgcgtgcca 6240
ggcacttcca ttcggggaag atagtgtta attcatctgg cacgattctc acttgccacc 6300
ctcgattatg caaghtaatt aaatccacac tgggtggccac ctgcctcga aggggttcat 6360
tggccaaca gagcctacct cttttcctag aacagaaagg gggaagtggg tctagcataa 6420
gttcatcggg aggtcttgca tccatggtta agattcccgg aagtaaattcc ttatcaaaat 6480
agctgatggg agtgggggtca tctaaggcca tttgccattc tcgagctgcc agtgccgcgt 6540
catatgggtt aaggggactg ccccaggga tgggatgggt gagagcagag gcatacatgc 6600
cacagatgtc atagacgtag atgggatcct caaagatgcc tatgtaggtt ggatagcatc 6660
gccccctct gatacttgt cgcacatagt catatagttc atgtgatggc gctagcagcc 6720
ccggacccaa gttggtgcga ttgggttttt ctgttctgta gacgatctgg cgaaagatgg 6780
cgtgagaatt ggaagagatg gtgggtcttt gaaaaatgtt gaaatgggca tgaggtagac 6840
ctacagagtc tctgacaaag tgggcataag attcttgaag cttggttacc agttcggcgg 6900
tgacaagtac gtctagggcg cagtagtcaa gtgtttcttg aatgatgtca taacctggtt 6960
ggtttttctt tttccacagt tcgcggttga gaaggtattc ttcgcgatcc ttccagtact 7020
cttctagcgg aaaccctct ttgtctgcac ggtaagatcc tagcatgtag aactgattaa 7080
ctgccttgta agggcagcag cccttctcta cgggtagaga gtatgcttga gcagcttttc 7140
gtagcgaagc gtgagtaagg gcaaagggtgt ctctgacat gactttgaga aattgggtatt 7200
tgaagtccat gtcgtcacag gtcctctgtt ccagagttg gaagtctacc cgtttcttgt 7260

aggcgggggtt gggcaaagcg aaagtaacat cattgaagag aatcttaccg gctctgggca 7320
taaaattgcg agtgatgcfg aaaggctgtg gtacttccgc tcgattgttg atcacctggg 7380
cagctaggac gatttcgtcg aaaccgttga tgttgtgtcc tacgatgtat aattctatga 7440
aacgcggcgt gcctctgacg tgaggtagct tactgagctc atcaaagggt aggtctgttg 7500
ggtcagataa ggcgtagtgt tcgagagccc attcgtgcag gtgaggattt gcatgtagga 7560
atgatgacca aagatctacc gccagtgtg tttgtaactg gtcccgatac tgacgaaaat 7620
gccggccaat tgccattttt tctggagtga cacagtagaa ggttctgggg tcttggtgcc 7680
atcgatccca cttgagtta atggctagat cgtgggccat gttgacgaga cgctcttctc 7740
ctgagagttt catgaccagc atgaaaggaa ctagttgttt gccaaaggat cccatccagg 7800
tgtaagtttc cacatcgtag gtcaggaaga gtctttctgt gcgaggatga gagccgatcg 7860
ggaagaactg gatttcctgc caccagttgg aggattggct gttgatgtga tggaagtaga 7920
agtttctgcg gcgcgccgag cattcgtgtt tgtgcttgta cagacggccg cagtagtcgc 7980
agcgttgcaac gggttgtatc tcgtgaatga gctgtacctg gcttcccttg acgagaaatt 8040
tcagtgggaa gccgaggcct ggcgattgta tctcgtgctc ttctatatc gctgtatcgg 8100
cctgttcac tctgttttcg atggtggta tgctgacgag ccccgcgagg aggcaagtcc 8160
agacctcggc gcgggagggg cggagctgaa ggacgagagc gcgcaggctg gagctgtcca 8220
gagtcctgag acgctgcgga ctcaggttag taggtaggga cagaagatta acttgcatga 8280
tcttttccag ggcgtgcggg aggttcagat ggtacttgat ttccacagg tctgtttag 8340
agacgtcaat ggcttgcaag gttccgtgtc ctttgggcgc cactaccgta ctttgtttt 8400
ttcttttgat cgggtgggtgc tctcttgctt cttgcatgct cagaagcggg gacggggacg 8460
cgcgccgggc ggcagcggtt gttccggacc cgggggcatg gctggtagtg gcacgtcggc 8520
gccgcgcacg ggcaggttct ggtattgcgc tctgagaaga cttgcgtgcg ccaccacgcg 8580
tcgattgacg tcttgatatc gacgtctctg ggtgaaagct accggccccg tgagcttgaa 8640
cctgaaagag agttcaacag aatcaatttc ggtatcgta acggcagctt gtctcagtat 8700
ttcttgtagc tcaccagagt tgcctggta ggcatctcc gccatgaact gctcgatttc 8760
ttcctctga agatctccgc gaccgctct ttcgacggtg gccgcgaggt cattggagat 8820
acggcccatg agttgggaga atgcattcat gccgcctcg ttccagacgc ggctgtaaac 8880
cacggcccc tcggagtctc ttgcgcgat caccacctga gcgaggtaa gctccacgtg 8940
tctggtgaag accgcatagt tgcataggcg ctgaaaaagg tagttgagtg tgggtggcaat 9000

gtgttcggcg acgaagaaat acatgatcca tcgtctcagc ggcatctcgc taacatcgcc 9060
cagagcttcc aagcgctcca tggcctcgta gaagtccacg gcaaaattaa aaaactggga 9120
gtttcgcgcg gacacgggtca attcctcctc gagaagacgg atgagttcgg ctatggtggc 9180
ccgtacttcg cgttcgaagg ctcccgggat ctcttcttcc tcttctatct cttcttccac 9240
taacatctct tcttcgtctt caggcggggg cggagggggc acgcggcgac gtcgacggcg 9300
cacgggcaaa cggtcgatga atcgttcaat gacctctccg cggcggcggc gcatggtttc 9360
agtgcggcg cggccgttct cgcgcggtcg cagagtaaaa acaccgccgc gcatctcctt 9420
aaagtgggtga ctgggaggtt ctccgtttgg gagggagagg gcgctgatta tacattttat 9480
taattggccc gtagggactg cgcgcagaga tctgatcgtg tcaagatcca cgggatctga 9540
aaacctttcg acgaaagcgt ctaaccagtc acagtcacaa ggtaggctga gtacggcttc 9600
ttgtgggcgg ggggtggttat gtgttcggtc tgggtcttct gtttcttctt catctcggga 9660
aggtgagacg atgctgctgg tgatgaaatt aaagtaggca gttctaagac ggccggatggt 9720
ggcgaggagc accaggtctt tgggtccggc ttgctggata cgcaggcgat tggccattcc 9780
ccaagcatta tcctgacatc tagcaagatc tttgtagtag tcttgcatga gccgttctac 9840
gggcacttct tcctcaccog ttctgccatg catacgtgtg agtccaaatc cgcgcattgg 9900
ttgtaccagt gccaagtcag ctacgactct ttcggcgagg atggcttgct gtacttgggt 9960
aagggtggct tgaaagtcac caaaatccac aaagcgggtg taagcccctg tattaatggt 10020
gtaagcacag ttggccatga ctgaccagtt aactgtctgg tgaccagggc gcacgagctc 10080
ggtgtattta aggcgcgaaat aggcgcggt gtcaaagatg taatcgttgc aggtgcgcac 10140
cagatactgg taccctataa gaaaatgcgg cgggtggttg cggtagagag gccatcgctc 10200
ttagctgga gcgccagggg cgaggtcttc caacataagg cggtagatagc cgtagatgta 10260
cctggacatc caggtgattc ctgcggcggg agtagaagcc cgaggaaact cgcgtacgcg 10320
gttccaaatg ttgcgtagcg gcatgaagta gttcattgta ggcacggtt gaccagttag 10380
gcgcgcgcag tcattgatgc tctatagaca cggagaaaat gaaagcgttc agcgactcga 10440
ctccgtagcc tggaggaacg tgaacgggtt gggtcgcggg gtaccccggt tcgagacttg 10500
tactcgagcc ggccggagcc gcggctaacg tggatttggc actcccgtct cgaccagcc 10560
tacaaaaatc caggatacgg aatcgagtcg ttttgcgtgt ttccgaatgg cagggaagtg 10620
agtcctatct tttttttttt tttgccgctc agatgcatcc cgtgctgcga cagatgcgcc 10680
cccaacaaca gccccctcg cagcagcagc agcagcaacc acaaaaggct gtccctgcaa 10740

ctactgcaac tgccgccgtg agcgggtgcgg gacagcccgc ctatgatctg gacttggaag 10800
agggcgaagg actggcacgt ctaggtgcgc cttcgcccga gcggcatccg cgagttcaac 10860
tgaaaaaaga ttctcgcgag gcgtatgtgc cccaacagaa cctatttaga gacagaagcg 10920
gcgaggagcc ggaggagatg cgagcttccc gctttaacgc gggtcgtgag ctgcgtcacg 10980
gtttggaccg aagacgagtg ttgcgagacg aggatttcga agttgatgaa gtgacaggga 11040
tcagtcctgc cagggcacac gtggctgcag ccaaccttgt atcggttac gagcagacag 11100
taaaggaaga gcgtaacttc caaaagtctt ttaataatca tgtgcgaacc ctgattgccc 11160
gcgaagaagt tacccttggt ttgatgcatt tgtgggattt gatggaagct atcattcaga 11220
accctactag caaacctctg accgcccagc tgtttctggt ggtgcaacac agcagagaca 11280
atgaggcttt cagagaggcg ctgctgaaca tcaccgaacc cgaggggaga tggttgtatg 11340
atcttatcaa cattctacag agtatcatag tgcaggagcg gagcctgggc ctggccgaga 11400
aggtagctgc catcaattac tcggttttga gcttgggaaa atattacgct cgcaaaatct 11460
acaagactcc atacgttccc atagacaagg aggtgaagat agatgggttc tacatgcgca 11520
tgacgctcaa ggtcttgacc ctgagcgatg atcttggggt gtatcgcaat gacagaatgc 11580
atcgcgcggt tagcgccagc aggaggcgcg agttaagcga cagggaactg atgcacagtt 11640
tgcaaagagc tctgactgga gctggaaccg agggtagaaa ttacttcgac atgggagctg 11700
acttgcagtg gcagcctagt cgcagggtc tgagcgccgc gacggcagga tgtgagcttc 11760
cttacataga agaggcggat gaaggcgagg aggaagaggg cgagtacttg gaagactgat 11820
ggcacaaccc gtgttttttg ctagatggaa cagcaagcac cggatcccgc aatgcgggcg 11880
gcgctgcaga gccagccgtc cggcattaac tctcggacg attggacca ggccatgcaa 11940
cgtatcatgg cgttgacgac tcgcaacccc gaagccttta gacagcaacc ccaggccaac 12000
cgtctatcgg ccatcatgga agctgtagtg ccttcccgat ctaatccac tcatgagaag 12060
gtcctggcca tcgtgaacgc gttggtggag aacaaagcta ttcgtccaga tgaggccgga 12120
ctggtataca acgctctctt agaacgcgtg gctcgctaca acagtagcaa tgtgcaaacc 12180
aatttgacc gtatgataac agatgtacgc gaagccgtgt ctcagcgca aaggttcag 12240
cgtgatgcca acctgggttc gctggtggcg ttaaagtctt tcttgagtac tcagcctgct 12300
aatgtgccgc gtggtcaaca ggattatact aactttttaa gtgctttgag actgatggta 12360
tcagaagtac ctcagagcga agtgtatcag tccggtcctg attacttctt tcagactagc 12420
agacagggtc tgcagacggt aaatctgagc caagctttta aaaacctta aggtttgtgg 12480

ggagtgcattg ccccggtagg agaaagagca accgtgtcta gcttgtaac tccgaactcc 12540
cgcctgttat tactgttggt agctcctttc accgacagcg gtagcatcga ccgtaattcc 12600
tatttgggtt acctactaaa cctgtatcgc gaagccatag ggcaaagtca ggtggacgag 12660
cagacctatc aagaaattac ccaagtcagt cgcgcttttg gacaggaaga cactggcagt 12720
ttggaagcca ctctgaactt cttgcttacc aatcggtctc aaaagatccc tcctcaatat 12780
gctcttactg cggaggagga gaggatcctt agatatgtgc agcagagcgt gggattgttt 12840
ctgatgcaag agggggcaac tccgactgca gcaactggaca tgacagcgcg aaatatggag 12900
cccagcatgt atgccagtaa ccgacctttc attaacaac tgctggacta cttgcacaga 12960
gctgccgcta tgaactctga ttatttcacc aatgccatct taaaccgca ctggctgccc 13020
ccacctggtt tctacacggg cgaatatgac atgcccagacc ctaatgacgg atttctgtgg 13080
gacgacgtgg acagcgatgt tttttcacct ctttctgac atcgcacgtg gaaaaaggaa 13140
ggcgggtgata gaatgcattc ttctgcatcg ctgtccgggg tcatgggtgc taccgcggt 13200
gagcccgagt ctgcaagtcc ttttctagt ctaccctttt ctctacacag tgtacgtagc 13260
agcgaagtgg gtagaataag tcgcccaggt ttaatggcg aagaggagta cctaaacgat 13320
tccttgctca gaccggcaag agaaaaaat ttcccaaaca atggaataga aagtttggtg 13380
gataaaatga gtagatggaa gacttatgct caggatcaca gagacgagcc tgggatcatg 13440
gggactacaa gtagagcgag ccgtagacgc cagcgccatg acagacagag gggctttgtg 13500
tgggacgatg aggattcggc cgatgatagc agcgtgttg acttgggtgg gagaggaagg 13560
ggcaaccgtt ttgctcattt gcgccctcgc ttgggtggta tgttgtgaaa aaaaataaaa 13620
aagaaaaact caccaaggcc atggcgacga gcgtacgttc gttcttcttt attatctgtg 13680
tctagtataa tgaggcgagt cgtgctaggc ggagcgggtg tgtatccgga gggctcctct 13740
ccttcgtacg agagcgtgat gcagcagcag caggcgacgg cggatgatgca atccccactg 13800
gaggctccct ttgtgcctcc gcgatacctg gcacctacgg agggcagaaa cagcattcgt 13860
tactcggaaac tggcacctca gtacgatacc accaggttgt atctggtgga caacaagtcg 13920
gcggacattg cttctctgaa ctatcagaat gaccacagca acttcttgac cacggtggtg 13980
cagaacaatg actttacccc tacggaagcc agcaccaga ccattaactt tgatgaacga 14040
tcgcgggtggg gcggtcagct aaagaccatc atgcatacta acatgccaaa cgtgaacgag 14100
tatatgttta gtaacaagtt caaagcgct gtgatggtgt ccagaaaacc tccgacggt 14160
gctgcagttg gggatactta tgatcacaag caggatattt tggaatatga gtggttcgag 14220

tttactttgc cagaaggcaa cttttcagtt actatgacta ttgatttgat gaacaatgcc 14280
atcatagata attacttgaa agtgggtaga cagaatggag tgcttgaaag tgacattggt 14340
gttaagtctg acaccaggaa cttcaagctg ggatgggata ccgaaaccaa gttgatcatg 14400
cctggagtgt atacgtatga agccttccat cctgacattg tcttactgcc tggctgcgga 14460
gtggatttta ccgagagtcg tttgagcaac cttcttggtg tcagaaaaaa acagccattt 14520
caagagggtt ttaagatttt gtatgaagat ttagaagggtg gtaatatcc ggccctcttg 14580
gatgtagatg cctatgagaa cagtaagaaa gaacaaaaag ccaaaataga agctgctaca 14640
gctgctgcag aagctaaggc aaacatagtt gccagcgact ctacaagggt tgctaacgct 14700
ggagagggtca gaggagacaa ttttgcgcca acacctgttc cgactgcaga atcattattg 14760
gccgatgtgt ctgaaggaaac ggacgtgaaa ctactatttc aacctgtaga aaaagatagt 14820
aagaatagaa gctataatgt gttggaagac aaaatcaaca cagcctatcg cagttggtat 14880
ctttcgtaca attatggcga tcccgaaaaa ggagtgcgtt cctggacatt gctcaccacc 14940
tcagatgtca cctgcggagc agagcaggtt tactggtcgc ttccagacat gatgaaggat 15000
cctgtcactt tccgctccac tagacaagtc agtaactacc ctgtggtggg tgcagagctt 15060
atgcccgtct tctcaaagag cttctacaac gaacaagctg tgtactccca gcagctccgc 15120
cagtccacct cgcttacgca cgtcttcaac cgctttcctg agaaccagat tttaatccgt 15180
ccgccggcgc ccaccattac caccgtcagt gaaaacgttc ctgctctcac agatcacggg 15240
accctgccgt tgcgcagcag tatccgggga gtccaacgtg tgaccgttac tgacgccaga 15300
cgccgcacct gtccctacgt gtacaaggca ctgggcatag tcgcaccgcg cgtcctttca 15360
agccgcactt tctaaaaaaa aaaaatgtcc attcttatct cgcccagtaa taacaccggt 15420
tggggtctgc gcgctccaag caagatgtac ggaggcgcac gcaaacgttc taccacacat 15480
cccgtgcgtg ttcgcggaca ttttcgcgct ccatgggggtg ccctcaaggg ccgcactcgc 15540
gttcgaacca ccgtcgatga tgtaatcgat cagggtggtg ccgacgcccg taattatact 15600
cctactgcgc ctacatctac tgtggatgca gttattgaca gtgtagtggc tgacgctcgc 15660
aactatgctc gacgtaagag ccggcgaagg cgcatcgcca gacgccaccg agctaccact 15720
gccatgcgag ccgcaagagc tctgctacga agagctagac gcgtggggcg aagagccatg 15780
cttagggcgg ccagacgtgc agcttcgggc gccagcgccg gcaggtcccg caggcaagca 15840
gccgctgtcg cagcggcgac tattgccgac atggcccaat cgcgaaagagg caatgtatac 15900
tggggtgcgtg acgctgccac cgggtcaacgt gtaccgctgc gcaccgctcc ccctcgcact 15960

tagaagatac tgagcagtct ccgatgttgt gtcccagcgg cgaggatgtc caagcgcaaa 16020
tacaaggaag aaatgctgca ggttatcgca cctgaagtct acggccaacc gttgaaggat 16080
gaaaaaaaaac cccgcaaaat caagcgggtt aaaaaggaca aaaaagaaga ggaagatggc 16140
gatgatgggc tggcggagtt tgtgcgcgag tttgccccac ggcgacgcgt gcaatggcgt 16200
gggcgcaaag ttcgacatgt gttgagacct ggaacttcgg tggctcttac acccggcgag 16260
cgttcaagcg ctacttttaa gcgttcctat gatgaggtgt acggggatga tgatattctt 16320
gagcaggcgg ctgaccgatt aggcgagttt gcttatggca agcgtagtag aataacttcc 16380
aaggatgaga cagtgtcaat acccttggat catggaaatc ccaccctag tcttaaaccg 16440
gtcactttgc agcaagtgtt acccgtaact ccgcgaacag gtgttaaacg cgaaggtgaa 16500
gatttgtatc ccactatgca actgatggta cccaaacgcc agaagttgga ggacgttttg 16560
gagaaagtaa aagtggatcc agatattcaa cctgaggtta aagtgagacc cattaagcag 16620
gtagcgcctg gtctgggggt acaaactgta gacattaaga ttcccactga aagtatggaa 16680
gtgcaaaactg aaccgcgaaa gcctactgcc acctccactg aagtgcaaac ggatccatgg 16740
atgcccacgc ctattacaac tgacgccgcc ggtcccactc gaagatcccg acgaaagtac 16800
gggccagcaa gtctgttgat gcccaattat gttgtacacc catctattat tcctactcct 16860
ggttaccgag gcaactcgta ctatcgcagc cgaaacagta cctcccgccg tcgccgcaag 16920
acacctgcaa atcgcagtcg tcgccgtaga cgcacaagca aaccgactcc cggcgccctg 16980
gtgcggcaag tgtaccgcaa tggtagtgcg gaacctttga cactgccgcg tgcgcgttac 17040
catccgagta tcatcactta atcaatgttg ccgctgcctc cttgcagata tggccctcac 17100
ttgtgcctt cgcgttccca tcaactggta ccgaggaaga aactcgcgcc gtagaagagg 17160
gatgttggga cgcggaatgc gacgctacag gcgacggcgt gctatccgca agcaattgcg 17220
gggtggtttt ttaccagcct taattccaat tatcgctgct gcaattggcg cgataccagg 17280
catagcttcc gtggcggttc aggcctcgca acgacattga cattggaaaa aaaacgtata 17340
aataaaaaaa aatacaatgg actctgacac tcctggtcct gtgactatgt tttcttagag 17400
atggaagaca tcaatttttc atccttggct ccgcgacacg gcacgaagcc gtacatgggc 17460
acctggagcg acatcggcac gagccaactg aacgggggcg ccttcaattg gagcagtatc 17520
tgagagcgggc ttaaaaattt tggtcaacc ataaaaacat acgggaacaa agcttggaa 17580
agcagtacag gacaggcgt tagaaataaa cttaaagacc agaacttcca aaaaaagta 17640
gtcgatggga tagcttccgg catcaatgga gtggtagatt tggctaacca ggctgtgcag 17700

aaaaagataa acagtcgttt ggacccgccg ccagcaaccc caggtgaaat gcaagtggag 17760
gaagaaattc ctccgccaga aaaacgaggc gacaagcgtc cgcgccccga tttggaagag 17820
acgctgggtga cgcgcgtaga tgaaccgcct tcttatgagg aagcaacgaa gcttggaatg 17880
cccaccacta gaccgatagc cccaatggcc accgggggtga tgaaaccttc tcagttgcat 17940
cgacccgtca ccttggattt gccccctccc cctgctgcta ctgctgtacc cgcttctaag 18000
cctgtcgtcg ccccgaaacc agtcgccgta gccaggtcac gtcccggggg cgctcctcgt 18060
ccaaatgcgc actggcaaaa tactctgaac agcatcgttg gtctaggcgt gcaaagtgtg 18120
aaacgccgtc gctgctttta attaaatatg gagtagcgct taacttgcct atctgtgtat 18180
atgtgtcatt acacgccgtc acagcagcag aggaaaaaag gaagaggtcg tgcgtcgacg 18240
ctgagttact ttcaagatgg ccaccccatc gatgctgccc caatgggcat acatgcacat 18300
cgccggacag gatgcttcgg agtacctgag tccgggtctg gtgcagttcg cccgcgccac 18360
agacacctac ttcaatctgg gaaataagtt tagaaatccc accgtagcgc cgaccacga 18420
tgtgaccacc gaccgtagcc agcggctcat gttgcgcttc gtgcccgttg accgggagga 18480
caatacatac tcttaciaaag tgcggtacac cctggccgtg ggcgacaaca gagtgtctgga 18540
tatggccagc acgttctttg acattagggg cgtgttggac agagggtcca gtttcaaacc 18600
ctattctggt acggcttaca actctctggc tcctaaaggc gtcctaaatg catctcaatg 18660
gattgcaaaa ggcgtaacca ctgcagcagc cgcaggcaat ggtgaagaag aacatgaaac 18720
agaggagaaa actgctactt acacttttgc caatgctcct gtaaaagccg aggctcaaatt 18780
tacaaaagag ggcttaccia taggtttgga gatttcagct gaaaacgaat ctaaaccat 18840
ctatgcagat aaactttatc agccagaacc tcaagtggga gatgaaactt ggactgacct 18900
agacggaaaa accgaagagt atggaggcag ggctctaaag cctactacta acatgaaacc 18960
ctgttacggg tcctatgcga agcctactaa tttaaaaggt ggtcaggcaa aaccgaaaaa 19020
ctcggaaacc tcgagtgaag aaattgaata tgatattgac atggaatfff ttgataactc 19080
atcgcaaaga acaaacttca gtcctaaaat tgtcatgtat gcagaaaatg taggtttgga 19140
aacgccagac actcatgtag tgtacaaacc tggaacagaa gacacaagtt ccgaagctaa 19200
tttgggacaa cagtctatgc ccaacagacc caactacatt ggcttcagag ataactttat 19260
tggaactcatg tactataaca gtactggtaa catgggggtg ctggctggtc aagcgtctca 19320
gttaaattgca gtggttgact tgcaggacag aaacacagaa ctttcttacc aactcttgct 19380
tgactctctg ggcgacagaa ccagatactt tagcatgtgg aatcaggctg tggacagtta 19440

tgatcctgat gtacgtgtta ttgaaaatca tgggtgtggaa gatgaacttc ccaactattg 19500
ttttccactg gacggcatag gtgttccaac aaccagttac aaatcaatag ttccaaatgg 19560
agaagataat aataattgga aagaacctga agtaaattgga acaagtgaga tcggacaggg 19620
taatttgitt gccatggaaa ttaaccttca agccaatcta tggcgaagtt tcctttattc 19680
caatgtggct ctgtatctcc cagactcgta caaatacacc ccgtccaatg tcaactcttc 19740
agaaaacaaa aacacctacg actacatgaa cgggcgggtg gtgccgcat ctctagtaga 19800
cacctatgtg aacattgggtg ccaggtgggtc tctggatgcc atggacaatg tcaacccatt 19860
caaccaccac cgtaacgctg gcttgcgtta ccgatctatg cttctgggta acggacgtta 19920
tgtgcctttc cacatacaag tgcctcaaaa attcttcgct gttaaaaacc tgctgcttct 19980
cccaggctcc tacacttatg agtggaaact taggaaggat gtgaacatgg ttctacagag 20040
ttccctcggt aacgacctgc gggtagatgg cgccagcatc agtttcacga gcatcaacct 20100
ctatgctact tttttccca tggctcaca caccgcttcc acccttgaag ccatgctgcg 20160
gaatgacacc aatgatcagt cattcaacga ctacctatct gcagctaaca tgctctacc 20220
cattcctgcc aatgcaacca atattcccat ttccattcct tctcgcaact gggcggcttt 20280
cagaggctgg tcatttacca gactgaaaac caaagaaact ccctctttgg ggtctggatt 20340
tgaccctac tttgtctatt ctggttctat tccctacctg gatggtacct tctacctgaa 20400
ccacactttt aagaaggttt ccatcatgtt tgactcttca gtgagctggc ctggaaatga 20460
caggttacta tctcctaacg aatttgaaat aaagcgact gtggatggcg aaggctacaa 20520
cgtagcccaa tgcaacatga ccaaagactg gttcttggta cagatgctcg ccaactacaa 20580
catcggtat cagggttct acattccaga aggatacaaa gatcgcatgt attcattttt 20640
cagaaacttc cagcccatga gcaggcaggt ggttgatgag gtcaattaca aagacttcaa 20700
ggccgtcgcc atacctacc aacacaacaa ctctggcttt gtgggttaca tggctccgac 20760
catgcgcaa ggtcaacct atcccgctaa ctatccctat ccaactcattg gaacaactgc 20820
cgtaaattag gttacgcaga aaaagtctt gtgtgacaga accatgtggc gcataccgtt 20880
ctcgagcaac ttcatgtcta tgggggccct tacagacttg ggacagaata tgctctatgc 20940
caactcagct catgctctgg acatgacct tgaggtggat cccatggatg agcccacct 21000
gctttatctt ctcttcgaag ttttcgacgt ggtcagagtg catcagccac accgcggcat 21060
catcgaggca gtctacctgc gtacaccgtt ctcggccggt aacgctacca cgtaagaagc 21120
ttcttgcttc ttgcaaatag cagctgcaac catggcctgc ggatcccaaa acggctccag 21180

cgagcaagag ctcagagcca ttgtccaaga cctgggttgc ggaccctatt ttttgggaac 21240
ctacgataag cgcttcccgg ggttcatggc ccccgataag ctgcctgtg ccattgtaaa 21300
tacggccgga cgtgagacgg ggggagagca ctggttggct ttcggttgga acccacgttc 21360
taacacctgc tacctttttg atccttttgg attctcggat gatcgtctca aacagattta 21420
ccagtttgaa tatgagggtc tcctgcgccg cagcgctctt gctaccaagg accgctgtat 21480
tacgctggaa aaatctacc agaccgtgca gggcccccgt tctgccgcct gcggactttt 21540
ctgctgcatg ttccttcacg cctttgtgca ctggcctgac cgtcccatgg acggaaaccc 21600
caccatgaaa ttgctaactg gagtgccaaa caacatgctt cattctccta aagtccagcc 21660
caccctgtgt gacaatcaaa aagcactcta ccattttctt aataccatt cgccttattt 21720
tcgctctcat cgtacacaca tcgaaagggc cactgcgttc gaccgtatgg atgttcaata 21780
atgactcatg taaacaacgt gttcaataaa catcacttta tttttttaca tgtatcaagg 21840
ctctggatta cttatttatt tacaagtcga atgggttctg acgagaatca gaatgaccg 21900
caggcagtga tacgttgccg aactgatact tgggttgcca ctgaattcg ggaatcacca 21960
acttgggaac cggtatatcg ggcaggatgt cactccacag ctttctggtc agctgcaaag 22020
ctccaagcag gtcaggagcc gaaatcttga aatcacatt aggaccagt ctctgagcgc 22080
gagagttgcg gtacaccgga ttgcagcact gaaacacat cagcgacgga tgtctcacgc 22140
ttgccagcac ggtgggatct gcaatcatgc ccacatccag atcttcagca ttggcaatgc 22200
tgaacggggt catcttgca gctctgcctac ccatggcggg caccacaatta ggcttgtggt 22260
tgcaatcgca gtgcaggggg atcagtatca tcttggcctg atcctgtctg attcctggat 22320
acacggctct catgaaagca tcatattgct tgaaagcctg ctgggcttta ctaccctcg 22380
tataaaacat cccgcaggac ctgctcgaaa actggttagc tgcacagccg gcatcattca 22440
cacagcagcg gggtcattg ttggctattt gcaccacact tctgcccag cggttttggg 22500
tgattttggt tcgtcggga ttctccttta aggctcgtt tccgttctcg ctggccacat 22560
ccatctcgat aatctgctcc ttctgaatca taatattgcc atgcaggcac ttcagcttgc 22620
cctcataatc attgcagcca tgaggccaca acgcacagcc tgtacattcc caattatggt 22680
gggcgatctg agaaaaagaa tgtatcattc cctgcagaaa tcttccatc atcgtgctca 22740
gtgtcttgtg actagtgaat gttactgga tgcctcgggt ctcttcgttt acgtactggt 22800
gacagatgcg cttgtattgt tcgtgttgc caggcattag tttaaaacag gttctaagtt 22860
cgttatccag cctgtacttc tccatcagca gacacatcac ttccatgcct ttctcccaag 22920

cagacaccag gggcaagcta atcggattct taacagtgca ggcagcagct cctttagcca 22980
gagggtcatc tttagcgatc ttctcaatgc ttcttttgcc atccttctca acgatgcgca 23040
cgggcgggta gctgaaaccc actgctacaa gttgcgcctc ttctctttct tcttcgctgt 23100
cttgactgat gtcttgcattg gggatatgtt tggctttcct tggcttcttt ttggggggta 23160
tcggaggagg aggactgtcg ctccgttccg gagacaggga ggattgtgac gtttcgctca 23220
ccattaccaa ctgactgtcg gtagaagaac ctgacccac acggcgacag gtgtttttct 23280
tcggggggcag aggtggaggc gattgcgaag ggctgcggtc cgacctggaa ggcggatgac 23340
tggcagaacc ccttccgcgt tcgggggtgt gctccctgtg gcggtcgctt aactgatttc 23400
cttcgcggct ggccattgtg ttctcctagg cagagaaaca acagacatgg aaactcagcc 23460
attgctgtca acatcgccac gagtgccatc acatctcgtc ctcagcgacg aggaaaagga 23520
gcagagctta agcattccac cgcccagtcc tgccaccacc tctaccctag aagataagga 23580
ggtcgacgca tctcatgaca tgcagaataa aaaagcgaaa gagtctgaga cagacatcga 23640
gcaagacccg ggctatgtga caccggtgga acacgaggaa gaggttgaaac gctttctaga 23700
gagagaggat gaaaactgcc caaaacagcg agcagataac tatcaccaag atgctggaaa 23760
tagggatcag aacaccgact acctcatagg gcttgacggg gaagacgcgc tccttaaaca 23820
tctagcaaga cagtgcgtca tagtcaagga tgcattattg gacagaactg aagtgcccat 23880
cagtgtggaa gagctcagct gcgcctacga gcttaacctt ttttcacctc gtactcccc 23940
caaacgtcag ccaaacggca cctgcgagcc aaatcctcgc ttaaactttt atccagcttt 24000
tgctgtgcca gaagtactgg ctacctatca catctttttt aaaaatcaaa aaattccagt 24060
ctcctgccgc gctaategca cccgcgccga tgccctactc aatctgggac ctggttcacg 24120
cttacctgat atagcttctt tggaagaggt tcaaagatc ttcgagggtc tgggcaataa 24180
tgagactcgg gccgcaaatg ctctgcaaaa gggagaaaat ggcattgatg agcatcacag 24240
cgttctgggtg gaattggaag gcgataatgc cagactcgca gtactcaagc gaagcgctga 24300
ggtcacacac ttcgcatatc ccgctgtcaa cctgccccct aaagtcatga cggcggtcat 24360
ggaccagtta ctcatthaagc gcgcaagtcc cctttcagaa gacatgcatg acccagatgc 24420
ctgtgatgag ggtaaaccag tggtcagtga tgagcagcta acccgatggc tgggcaccga 24480
ctctccccgg gatttgggaag agcgtcgcaa gcttatgatg gccgtgggtgc tggttaccgt 24540
agaactagag tgtctccgac gtttctttac cgattcagaa accttgcgca aactcgaaga 24600
gaatctgcac tacactttta gacacggctt tgtgcggcag gcatgcaaga tatctaactg 24660

ggaactcacc aacctggttt cctacatggg tattctgcat gagaatcgcc taggacaaag 24720
cgtgctgcac agcaccctta agggggaagc cgcctgtgat tacatccgcg attgtgtcta 24780
tctctacctg tgccacacgt ggcaaaccgg catgggtgta tggcagcaat gtttagaaga 24840
acagaacttg aaagagcttg acaagctctt acagaaatct ctttaaggttc tgtggacagg 24900
gttcgacgag cgcaccgtcg cttccgacct ggcagacctc atcttcccag agcgtctcag 24960
ggttactttg cgaaacggat tgcctgactt tatgagccag agcatgctta acaattttcg 25020
ctctttcatc ctggaacgct ccggtatcct gcccgccacc tgctgcgcac tgccctccga 25080
ctttgtgcct ctcacctacc gcgagtgcce ccgcccgtta tggagtcact gctacctgtt 25140
ccgtctggcc aactatctct cctaccactc ggatgtgatc gaggatgtga gcggagacgg 25200
cttgctggag tgccactgcc gctgcaatct gtgcacgccc caccgggtccc tagcttgcaa 25260
ccccagttg atgagcgaaa ccagataat aggcaccttt gaattgcaag gccccagcag 25320
ccaaggcgat gggctttctc ctgggcaaag tttaaaactg accccgggac tgtggacctc 25380
cgcctacttg cgcaagtttg ctccggaaga ttaccacccc tatgaaatca agttctatga 25440
ggaccaatca cagcctcaa aggccgaact ttcggcttgc gtcacaccc agggggcaat 25500
tctggcccaa ttgcaagcca tccaaaaatc ccgccaagaa tttctactga aaaagggtaa 25560
gggggtctac cttgaccccc agaccggcga ggaactcaac acaaggttcc ctcaggatgt 25620
cccaacgacg agaaaacaag aagttgaagg tgcagccgcc gccccagaa gatatggagg 25680
aagattggga cagtcaggca gaggaggcgg aggaggacag tctggaggac agtctggagg 25740
aagacagttt ggaggaggaa aacgaggagg cagaggaggt ggaagaagta accgccgaca 25800
aacagttatc ctcggctgcg gagacaagca acagcgctac catctccgct ccgagtcgag 25860
gaaccggcg gcgtcccagc agtagatggg acgagaccgg acgtttcccg aaccaacca 25920
gcgcttcaa gaccggtaag aaggatcggc agggatacaa gtcctggcgg gggcataaga 25980
atgccatcat ctctgcttg catgagtgcg ggggcaacat atccttcacg cggcgctact 26040
tgctattcca ccatggggtg aactttccgc gcaatgtttt gcattactac cgtcacctcc 26100
acagccccta ctatagccag caaatcccga cagtctcgac agataaagac agcggcggcg 26160
acctccaaca gaaaaccagc agcggcagtt agaaaataca caacaagtgc agcaacagga 26220
ggattaaaga ttacagccaa cgagccagcg caaacccgag agttaagaaa tcggatcttt 26280
ccaaccctgt atgccatctt ccagcagagt cggggtcaag agcaggaact gaaaataaaa 26340
aaccgatctc tgcgttcgct caccagaagt tgtttgtatc acaagagcga agatcaactt 26400

cagcgcactc tcgaggacgc cgaggctctc ttcaacaagt actgcgcgct gactcttaaa 26460
gagtaggcag cgaccgcgct tattcaaaaa aggcgggaat tacatcatcc tcgacatgag 26520
taaagaaatt cccacgcctt acatgtggag ttatcaaccc caaatgggat tggcagcagg 26580
cgctcccag gactactcca cccgcatgaa ttggctcagc gccgggcctt ctatgatttc 26640
tcgagttaat gatatacgcg cctaccgaaa ccaaatactt ttggaacagt cagctcttac 26700
caccacgccc cgccaacacc ttaatcccag aaattggccc gccgccctag tgtaccagga 26760
aagtcccgct cccaccactg tattacttcc tcgagacgcc caggccgaag tccaaatgac 26820
taatgcaggt gcgcagttag ctggcggctc caccctatgt cgtcacaggc ctcggcataa 26880
tataaaacgc ctgatgatca gaggccgagg tatccagctc aacgacgagt cggtagagctc 26940
tccgcttggt ctacgaccag acggaatctt tcagattgcc ggctgcggga gatcttcctt 27000
caccctcgt caggctgttc tgactttgga aagttcgtct tcgcaacccc gctcgggcgg 27060
aatcgggacc gttcaatttg tagaggagtt tactccctct gtctacttca accccttctc 27120
cggatctcct gggcactacc cggacgagtt cataccgaac ttcgacgca ttagcgagtc 27180
agtggacggc tacgattgat gtctggtgac gcgctgagc tatctcggct gcgacatcta 27240
gaccactgcc gccgctttcg ctgctttgcc cgggaactta ttgagttcat ctacttcgaa 27300
ctccccaagg atcaccctca aggtccggcc cacggagtgcc ggattactat cgaaggcaaa 27360
atagactctc gcctgcaacg aattttctcc cagcggcccc tgctgatcga gcgagaccag 27420
ggaaacacca cggtttccat ctactgcatt tgtaatcacc ccggattgca tgaaagcctt 27480
tgctgtctta tgtgtactga gtttaataaa aactgaatta agactctcct acggactgcc 27540
gcttcttcaa cccgattttt acaaccagaa gaacaaaact tttcctgtcg tccaggactc 27600
tgttaacttc acctttccta ctacaaaact agaagctcaa cgactacacc gcttttccag 27660
aagcattttc cctactaata ctactttcaa aaccggaggt gagctccacg gtctccctac 27720
agaaaaccct tgggtggaag cgggccttgt agtactagga attcttgagg gtgggcttgt 27780
gattattctt tgctacctat acacaccttg cttcactttc ctagtggtgt tgtggtattg 27840
gtttaaaaaa tggggcccat actagtcttg cttgttttac tttcgtttt ggaaccgggt 27900
tctgccaaatt acgatccatg tctagacttt gaccagaaa actgcacact tacttttgca 27960
cccgacacaa gccgcatctg tggagttctt attaagtgcg gatgggaatg caggctccgtt 28020
gaaattacac acaataacaa aacctggaac aataccttat ccaccacatg ggagccagga 28080
gttcccaggt ggtacactgt ctctgtccga ggtcctgacg gttccatccg cattagtaac 28140

aacactttca ttttttctga aatgtgcat ctggccatgt tcatgagcaa acagtattct 28200
ctatggcctc ctagcaagga caacatcgta acgttctcca ttgcttattg cttgtgcat 28260
tgccttctta ctgctttact gtgcgtatgc atacacctgc ttgtaaccac tcgcatcaaa 28320
aacgccaata acaaagaaaa aatgccttaa cctctttctg tttacagaca tggcttctct 28380
tacatctctc atatttgtca gcattgtcac tgccgctcac ggacaaacag tcgtctctat 28440
cccactagga cataattaca ctctcatagg accccaatc acttcagagg tcatctggac 28500
caaactggga agcggttgatt actttgatat aatctgtaac aaaacaaaac caataatagt 28560
aacttgcaac atacaaaatc ttacattgat taatgttagc aaagtttaca gcggttacta 28620
ttatggttat gacagataca gtagtcaata tagaaattac ttggttcgtg ttaccagtt 28680
gaaaaccag aaaatgccaa atatggcaaa gattcgatcc gatgacaatt ctctagaaac 28740
ttttacatct cccaccacac cgcacgaaaa aaacatccca gattcaatga ttgcaattgt 28800
tgcagcgggtg gcagtgggtga tggcactaat aataatatgc atgcttttat atgcttgtcg 28860
ctacaaaaag tttcatccta aaaaacaaga tctctacta aggcttaaca ttttaatttct 28920
ttttatacag ccatggtttc cactaccaca ttccttatgc ttactagtct cgcaactctg 28980
acttctgctc gctcacacct cactgtaact ataggctcaa actgcacact aaaaggacct 29040
caagggtggtc atgtcttttg gtggagaata tatgacaatg gatggtttac aaaaccatgt 29100
gaccaacctg gtagattttt ctgcaacggc agagacctaa ccattatcaa cgtgacagca 29160
aatgacaaag gcttctatta tggaaccgac tataaaagta gtttagatta taacattatt 29220
gtactgcat ctaccactcc agcaccgccg acaactactt tctctagcag cagtgtcgct 29280
aacaatacaa tttccaatcc aacctttgcc gcgcttttaa aacgcactgt gaataattct 29340
acaacttcac atacaacaat ttccacttca acaatcagca tcatcgctgc agtgacaatt 29400
ggaatatcta ttcttgtttt taccataacc tactacgct gctgctatag aaaagacaaa 29460
cataaagggtg atccattact tagatttgat atttaatttg ttcttttttt ttatttacag 29520
tatggtgaac accaatcatg gtacctagaa atttcttctt caccatactc atctgtgctt 29580
ttaatgtttg cgctactttc acagcagtag ccacagcaac cccagactgt ataggagcat 29640
ttgcttccta tgcacttttt gcttttgtaa cttgcatctg cgtatgtagc atagtctgcc 29700
tggttattaa ttttttccaa cttctagact ggatccttgt gcgaattgcc tacctgcgcc 29760
accatcccga ataccgcaac caaaatatcg cggcacttct tagactcatc taaaaccatg 29820
caggctatac taccaatatt tttgcttcta ttgcttcct acgtgtctc aacccagct 29880

gcctatagta ctccaccaga acaccttaga aaatgcaa tccaacaacc gtggtcattt 29940
cttgcttgct atcgagaaaa atcagaaatc cccccaatt taataatgat tgctggaata 30000
attaatataa tctgttgac cataatttca tttttgatat acccctatt tgattttggc 30060
tggaatgctc ccaatgcaca tgatcatcca caagaccag aggaacacat tccccacaa 30120
aacatgcaac atccaatagc gctaatagat tacgaaagt aaccacaacc cccactactc 30180
cctgctatta gttacttcaa cctaaccggc ggagatgact gaaacactca ccacctcaa 30240
ttccgccgag gatctgctcg atatggacgg ccgctgtca gaacaacgac ttgccaact 30300
acgcatccgc cagcagcagg aacgcgtggc caaagagctc agagatgtca tccaaattca 30360
ccaatgcaaa aaaggcatat tctgttttgt aaaacaagcc aagatatcct acgagatcac 30420
cgctactgac catcgctct cttacgaact tggccccaa cgacaaaaat ttacctgcat 30480
ggtgggaatc aaccatag ttatcaccca acaaagtga gataactaagg gttgcattca 30540
ctgctcctgc gattccatcg agtgcaccta caccctgctg aagaccctat gcggcctaag 30600
agacctgcta ccaatgaatt aaaaaaaaaat gattaataaa aaatcactta cttgaaatca 30660
gcaataaggt ctctgttgaa attttctccc agcagcacct cacttccctc ttcccaactc 30720
tggtattcta aaccocgttc agcggcatac tttctccata ctttaagggt gatgtcaaat 30780
tttagctcct ctctgtacc cacaatcttc atgtctttct tcccagatga ccaagagagt 30840
ccggctcagt gactccttca accctgtcta cccctatgaa gatgaaagca cctcccaaca 30900
cccctttata aaccagggt ttatttcccc aaatggcttc acacaaagcc cagacggagt 30960
tcttacttta aaatgttta cccactaac aaccacaggc ggatctctac agctaaaagt 31020
gggaggggga cttacagtgg atgacactga tggtaacctta caagaaaaca tacgtgctac 31080
agcaccatt actaaaaata atcactctgt agaactatcc attggaaatg gattagaaac 31140
tcaaaacaat aaactatgtg ccaaattggg aaatgggtta aaatttaaca acggtgacat 31200
ttgtataaag gatagtatta acaccttatg gactggaata aacctccac ctaactgtca 31260
aattgtggaa aacactaata caaatgatgg caaacttact ttagtattag taaaaaatgg 31320
agggcttggt aatggctacg tgtctctagt tgggtgtatca gacactgtga accaaatgtt 31380
cacacaaaag acagcaaaca tccaattaag attatatatt gactcttctg gaaatctatt 31440
aactgaggaa tcagacttaa aaattccact taaaaataaa tcttctacag cgaccagtga 31500
aactgtagcc agcagcaaag cctttatgcc aagtactaca gcttatccct tcaacaccac 31560
tactagggat agtgaaaact acattcatgg aatatgttac tacatgacta gttatgatag 31620

aagtctat ttt cccttgaaca tttctataat gctaaacagc cgtatgattt cttccaatgt 31680
tgcctatgcc atacaatttg aatggaatct aaatgcaagt gaatctccag aaagcaacat 31740
agctacgctg accacatccc cttttttctt ttcttacatt acagaagacg acaactaaaa 31800
taaagtttaa gtgtttttat ttaaaatcac aaaattcgag tagttat ttt gcctccacct 31860
tcccatttga cagaatacac caatctctcc ccacgcacag ctttaaacad ttggatacca 31920
ttagagatag acattgtttt agattccaca ttccaaacag tttcagagcg agccaatctg 31980
gggtcagtga tagataaaaa tccatcgcca tagtctttta aagcgctttc acagtccaac 32040
tgctgcggat gcgactccgg agtttggatc acggctcatct ggaagaagaa cgatgggaat 32100
cataatccga aaacgggtatc ggacgattgt gtctcatcaa accacaagc agccgctgtc 32160
tgctgcgctc cgtgcgactg ctgtttatgg gatcagggtc cacagtttcc tgaagcatga 32220
ttttaatagc ccttaacatc aactttctgg tgcgatgcgc gcagcaacgc attctgattt 32280
cactcaaate tttgcagtag gtacaacaca ttattacaat attgtttaat aaaccataat 32340
taaaagcgct ccagccaaaa ctcatatctg atataatcgc ccctgcatga ccatcatacc 32400
aaagtttaat ataaattaaa tgacgttccc tcaaaaacac actaccaca tacatgatct 32460
cttttggcat gtgcatatta acaatctgtc tgtaccatgg acaacgttgg ttaatcatgc 32520
aaccaatat aaccttccgg aaccacactg ccaacaccgc tccccagcc atgcattgaa 32580
gtgaaccctg ctgattacaa tgacaatgaa gaaccaatt ctctcgaccg tgaatcactt 32640
gagaatgaaa aatatctata gtggcacaac atagacataa atgcatgcat cttctcataa 32700
tttttaactc ctgaggattt agaaacatat cccagggaat aggaagctct tgcagaacag 32760
taaagctggc agaacaagga agaccagaa cacaacttac actatgcata gtcatagtat 32820
cacaatctgg caacagcggg tggctttcag tcatagaagc tcgggtttca ttttctcac 32880
aacgtggtaa ctgggctctg gtgtaagggt gatgtctggc gcatgatgtc gagcgtgcgc 32940
gcaaccttgt cataatggag ttgcttctctg acattctcgt attttgtata gcaaaacgcg 33000
gccctggcag aacacactct tcttcgcctt ctatcctgcc gcttagcgtg ttccgtgtga 33060
tagttcaagt acagccacac tcttaagttg gtcaaaagaa tgctggcttc agttgtaate 33120
aaaactccat cgcactaat tgttctgagg aaatcatcca cggtagcata tgcaaatccc 33180
aaccaagcaa tgcaactgga ttgcgtttca agcaggagag gagagggaag agacggaaga 33240
accatgttaa tttttattcc aaacgatctc gcagtacttc aaattgtaga tcgcgcagat 33300
ggcatctctc gccccactg tgttgggtgaa aaagcacagc taaatcaaaa gaaatgcgat 33360

tttcaagggtg ctcaacgggtg gcttccaaca aagcctccac gcgcacatcc aagaacaaaa 33420
gaataccaaa agaaggagca ttttctaact cctcaatcat catattacat tcctgcacca 33480
ttcccagata attttcagct ttccagcctt gaattattcg tgtcagttct tgtggtaaatt 33540
ccaatccaca cattacaaac aggtcccgga gggcgccctc caccaccatt cttaaacaca 33600
ccctcataat gacaaaatat cttgctcctg tgtcacctgt agcgaattga gaatggcaac 33660
atcaattgac atgcccttgg ctctaagttc ttctttaagt tctagttgta aaaactctct 33720
catattatca ccaaactgct tagccagaag cccccggga acaagagcag gggacgctac 33780
agtgcagtac aagcgcagac ctcccgaatt ggctccagca aaaacaagat tggaataagc 33840
atattgggaa ccaccagtaa tatcatcgaa gttgctggaa atataatcag gcagagtttc 33900
ttgtagaaat tgaataaaag aaaaatttgc caaaaâaaca ttcaaacct ctgggatgca 33960
aatgcaatag gttaccgcg cgcgctccaa cattgttagt tttgaattag tctgcaaaaa 34020
taaaaaaaaa acaagcgtca tatcatagta gcctgacgaa caggtggata aatcagtcct 34080
tccatcacia gacaagccac aggggtctcca gctcgaccct cgtaaacct gtcacgtga 34140
ttaaacaaca gcaccgaaag ttcctcgcg tgaccagcat gaataagtct tgatgaagca 34200
tacaatccag acatgttagc atcagttaag gagaaaaaac agccaacata gcctttgggt 34260
ataattatgc ttaatcgtaa gtatagcaa gccaccctc gcggatacaa agtaaaaggc 34320
acaggagaat aaaaaatata attatttctc tgctgctggt taggcaacgt cgccccggt 34380
ccctctaaat acacatacaa agcctcatca gccatggctt accagagaaa gtacagcggg 34440
cacacaaacc acaagctcta aagtcactct ccaacctstc cacaatatat atacacaagc 34500
cctaaactga cgtaatggga ctaaagtgt aaaaatcccg ccaaaccaca cacacacccc 34560
gaaactgcgt caccaggga aagtacagtt tcaattccgc aatcccaaca agcgtcactt 34620
cctctttctc acggtacgtc acatcccatt aacttacaac gtcattttcc cacggccgcg 34680
ccgccccctt taaccgttaa cccacagcc aatcaccaca cggccacac tttttaaaat 34740
cacctcattt acatattggc accattccat ctataaggta tattattgat gatg 34794

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07146

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/861 // C12N5/10, C12N7/01

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00-90, C12N1/00-7/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO 00/70071 A1 (CLUCELL HOLLAND BV), 23 November, 2000 (23.11.00), & AU 200049547 A & EP 1054064 A1 & JP 2002-543846 A	1, 2, 7/ 3-6, 8-21
Y	WO 01/90392 A1 (SUMITOMO PHARM. CO., LTD.), 29 November, 2001 (29.11.01), & AU 200158828 A & EP 1284294 A1	1-21
Y	WO 00/73477 A1 (GENZYME CORP.), 07 December, 2000 (07.12.00), & AU 200051616 A & EP 1180156 A1 & JP 2003-501040 A	1-21

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
11 July, 2003 (11.07.03)

Date of mailing of the international search report
29 July, 2003 (29.07.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N15/861 // C12N 5/10, C12N 7/01

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N15/00~90, C12N 1/00~7/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN) WPI (DIALOG) BIOSIS (DIALOG)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	WO 00/70071 A1 (CLUCCELL HOLLAND BV) 2000. 11. 23 & AU 200049547 A & EP 1054064 A1 & JP 2002-543846 A	1, 2, 7/ 3-6, 8-21
Y	WO 01/90392 A1 (SUMITOMO PHARM. CO. LTD.) 2001. 11. 29 & AU 200158828 A & EP 1284294 A1	1-21
Y	WO 00/73477 A1 (GENZYME CORP.) 2000. 12. 07 & AU 200051616 A & EP 1180156 A1 & JP 2003-501040 A	1-21

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11. 07. 03

国際調査報告の発送日

29.07.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齊藤 真由美

4B

8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448